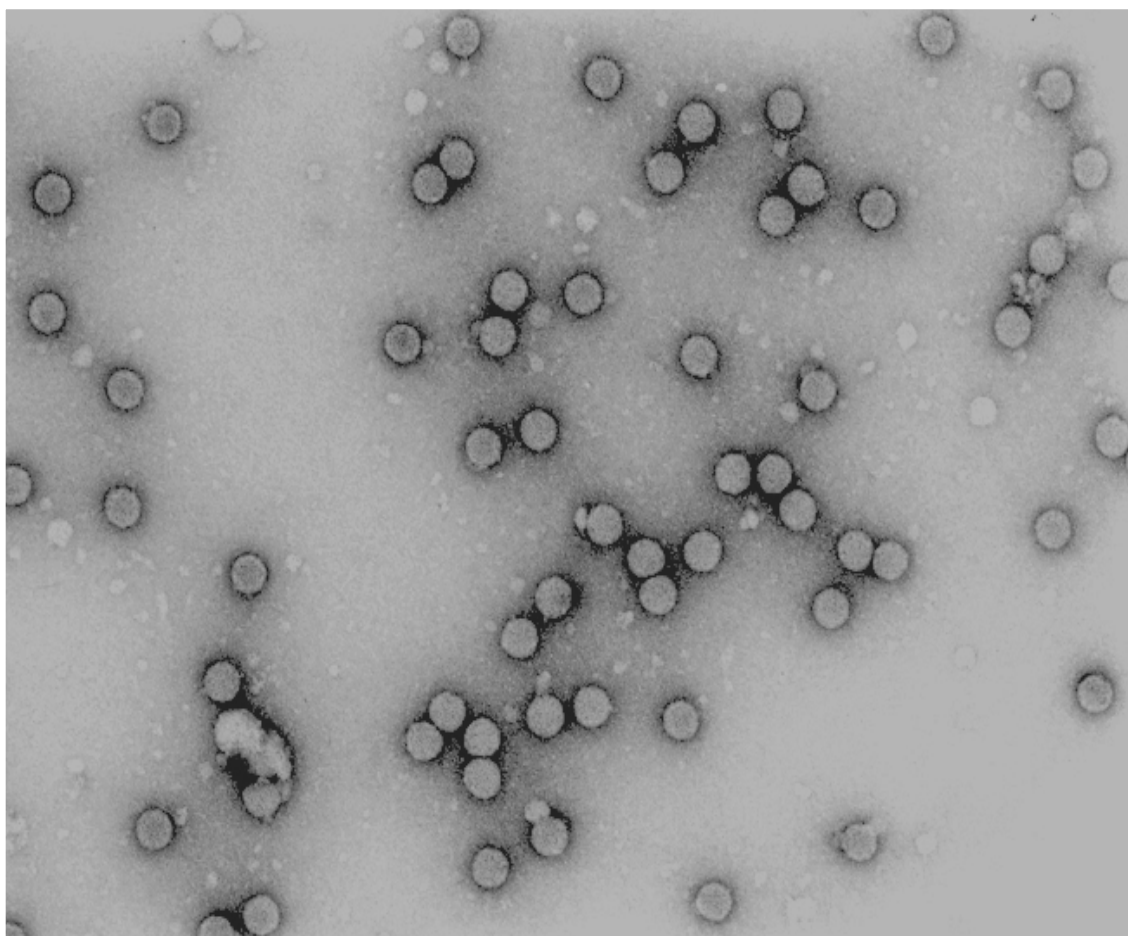




Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Caracterización y bases moleculares de la persistencia y la virulencia del virus de la fiebre aftosa en cultivos celulares



Mónica Herrera Quintana

Madrid 2006

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Caracterización y bases moleculares de la
persistencia y la virulencia del virus de la
fiebre aftosa en cultivos celulares**

TESIS DOCTORAL

Mónica Herrera Quintana
Madrid, 2006

Memoria presentada por la Licenciada en Biología Mónica Herrera Quintana para optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Noviembre, 2006.

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, bajo la dirección del Dr. Esteban Domingo Solans y financiado por una beca Predoctoral de Formación de Investigadores (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia.

A mi madre

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Esteban Domingo el haberme brindado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral en su laboratorio, así como su ayuda durante estos años.

A la Dra. Cristina Escarmís, por su apoyo y por tener siempre un momento para aconsejarme. A todos mis compañeros del laboratorio 303. A los que se fueron: Carmen, Nonia, Antero, Gema, Clara (muchísimas gracias por tus ánimos durante una etapa especialmente difícil para mí, y por seguir contando contigo, ¡eres un sol!) y Juan (gracias por "llevarnos de viaje" a Tanzania, Egipto, Vietnam, los Alpes,..., pero sobre todo por demostrarme que eres un gran amigo, por tu apoyo y por animarme día tras día). Y, por supuesto, a los que continúan: Ana, Armando, Celia (gracias por tu ayuda en la última etapa de la Tesis y por haber sido mi última "profe postdoc", ¡eres genial!), Marta, Mercedes, Mónica, Noemí, Rubén, Samuel, Tania, y Vero. ¡Gracias a todos por ser los mejores compañeros que se puede tener!

Me gustaría dar las gracias de forma especial a mis "dos galleguiñas favoritas": Claudia y Ana. Gracias por todos los buenos momentos que pasamos juntas, por vuestra continua ayuda y apoyo, no lo olvidaré nunca. Me llevo dos grandes amigas. Claudia, gracias por el cariño y la dulzura que me has regalado siempre. Ana, gracias por el tiempo que estuvimos trabajando juntas, por todo lo que aprendí (y sigo aprendiendo) de ti, a nivel científico y personal, nunca te estaré lo suficientemente agradecida.

No puedo dejar de dar las gracias a cuatro personas sin las que no sería quien soy, y no estaría aquí: Carola, Gloria, Maca y Prado. ¡Sois geniales! Mil gracias por estar siempre a mi lado, en los buenos y los malos momentos, dándome todo vuestro cariño y apoyo. Gracias por todos los buenos ratos (y las "buenas risas") que hemos vivido juntas, ¡y por todos los que nos quedan por vivir! Gracias por "soportarme" a diario durante estos años. ¡Os quiero!

A mis amigos del CBM. A Pepa, muchísimas gracias por estar a mi lado siempre que lo he necesitado, eres una gran amiga. A Aitor, por animarme desde el comienzo de la Tesis, ¡y por tantos CDs de buena música! A todos mis compañeros de cultivos, a M^a Ángeles y Alfonso, gracias a todos por vuestra simpatía y por la ayuda que me habéis ofrecido durante estos años, y por todos los momentos inolvidables que hemos vivido en el laboratorio 222.

Gracias a Elena E (por tantas y tantas tardes de...iterapia!), Elena S y M^a José por vuestra amistad, desde los tres añitos hasta hoy...¡y lo que nos queda! Gracias por vuestro cariño, amistad, comprensión...Gracias a mis "avutardas" (Elena, Ana, Elenita, Raquel...) (¿qué haría yo sin vosotras?).

A Elena y Noemí, gracias por apoyarme, quererme, y por haberme regalado momentos tan bonitos como los que hemos vivido juntas, y por todos los que, estoy segura, están por venir.

A mi gente de Robledo, por tantos y tan buenos veranos juntos. Me encanta teneros a mi lado año tras año.

A mis amigos de la piscina M86 (Ángel, Ana, María, Esther, Jorge, Rosario...). Por haberme animado durante todos los "chapuzones", "preparados, listos, ¡YA!", y demás historias que hemos compartido.

Gracias a mis "deportistas" favoritos del gimnasio: Marisa, Edu, Carmen, Bea, Andoni, Elena, Lola, Jose, María, Irma, Javi,...) por haberme escuchado, soportado y apoyado durante el último año de Tesis. Mil gracias por haber creado un "oasis" para mí.

A Germán, por cuidar de mí desde que nací hasta hoy. Gracias por estar a mi lado siempre que lo he necesitado.

A Rubén, porque en los últimos 7 años no has dejado nunca de apoyarme en todo, eres un ángel (claro, tanto tiempo entre las nubes...).

Quiero dar las gracias a todos los que, ya sea profesional o personalmente, han contribuido a que yo pueda leer esta Tesis.

Gracias, gracias, gracias, a toda mi familia. Mis abuelos, tíos (M^a Flor, Antonio, Maite, Fernando,...), primas (Maite, Marta, Nuria,...), por ser los mejores familiares del mundo, y por ofrecerme vuestro cariño y apoyo incondicional durante estos años. Me gustaría agradecer, de forma especial, a mi prima Laura, todo el tiempo que hemos pasado juntas. Eres genial. Sin ti no estaría aquí, sin ninguna duda. Gracias por tu complicidad, comprensión, cariño, paciencia,...

Y, por supuesto, dedico esta Tesis Doctoral a mi madre, mi referencia y ejemplo a seguir en la vida. Sin ti no habría llegado donde estoy. Gracias por luchar por mí, educarme como lo has hecho, quererme, respetarme, y apoyarme incondicionalmente. Te quiero muchísimo.

Abreviaturas

ACM	Anticuerpo monoclonal
ADP	Adenosina-5'-difosfato
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BaMV	Virus del mosaico del bambú
BSMV	Virus del mosaico de la cebada
cDNA	DNA copia
CMV	Virus del mosaico del pepino
cre	Elemento de replicación en <i>cis</i>
CSE	Elemento de secuencia conservada
CSFV	Virus de la fiebre porcina clásica
CTP	Citosina-5'-trifosfato
CVB3	Coxsackievirus B3
dATP	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
DEAE	Dietilaminoetil
DMEM	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
ec	Extracelular
e.c.p.	Efecto citopático
EDTA	Etilén diamino tetraacetato
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis
FA	Fiebre aftosa
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HAART	Terapia antirretroviral altamente activa
h.p.i.	Horas postinfección
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HS	Heparán sulfato
ic	Intracelular
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactósido
IRES	Sitio interno de entrada de ribosomas
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocítica

m.d.i.	Multiplicidad de infección
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NTP	Ribonucleótido-5'-trifosfato
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PoliA	Poliadenilato
PoliC	Polirribocitidilato
Rb	Ribavirina
RNA	Ácido ribonucleico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RpRd	RNA polimerasa RNA dependiente
RT	Retrotranscriptasa
RT-PCR	Reacción de transcripción inversa seguida de amplificación por PCR
SARS	Síndrome respiratorio severo agudo
SBF	Suero bovino fetal
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
sn	Sobrenadante
UFPs	Unidades formadoras de placa
UTP	Uridina-5'-trifosfato
UTR	Región genómica no codificante
VFA	Virus de la fiebre aftosa
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactósido

Códigos de una y tres letras de los aminoácidos

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	

Índice

Página

1.- Resumen en inglés (Summary).....	1
2.- Introducción.....	3
2.1.- Variabilidad genética de virus RNA. Cuasiespecies víricas.....	3
2.1.1.- Bases moleculares de la variabilidad genética de virus RNA.....	3
2.1.2.- Evolución de las cuasiespecies virales.....	5
2.1.3.- Eficacia biológica relativa de virus (“fitness”).....	5
2.1.4.- Implicaciones biológicas de la estructura en cuasiespecies.....	8
2.2.- La fiebre aftosa.....	11
2.3.- El virus de la fiebre aftosa.....	12
2.3.1.- Organización genómica y proteínas codificadas por el virus de la fiebre aftosa.....	13
2.3.1.1.- Región 5’ no codificante.....	13
2.3.1.2.- Región codificante.....	15
2.3.1.3.- Región 3’ no codificante.....	17
2.3.2.- Estructura de la cápsida del VFA. Reconocimiento de anticuerpos y receptores celulares.....	18
2.4.- Traducción y replicación del RNA del VFA.....	21
2.4.1.- Relación entre moléculas de RNA de polaridad positiva y negativa.....	22
2.5.- Infecciones persistentes.....	23
2.5.1.- Generalidades.....	23
2.5.2.- Persistencia <i>in vivo</i>	23
2.6.- Persistencia del VFA.....	25
2.6.1.- Persistencia del VFA en cultivos celulares.....	25
2.6.2.- La virulencia en virus persistentes.....	28
2.7.- Virulencia viral.....	29
2.7.1.- Relación entre capacidad replicativa (“fitness”) y virulencia.....	29
2.7.2.- Determinantes de virulencia.....	30
3.- Objetivos.....	33

4.- Materiales y Métodos.....	35
4.1.- Cultivo de células eucarióticas.....	35
4.2.- Virus.....	36
4.2.1.- Variantes del VFA.....	36
4.2.2.- Virus quiméricos.....	37
4.3.- Infecciones.....	40
4.3.1.- Infecciones en medio líquido.....	40
4.3.3.- Plaqueo de virus en medio de agar semisólido en células BHK-21.....	40
4.4.- Ensayo de virulencia.....	40
4.5.- Purificación de virus.....	41
4.6.- Extracción de virus R intracelular de células R.....	41
4.7.- Extracción de RNA vírico.....	41
4.7.1.- Extracción de RNA vírico extracelular.....	41
4.7.2.- Extracción de RNA vírico intracelular.....	42
4.8.- Obtención de cDNA y amplificación por RT-PCR de RNA vírico.....	42
4.9.- Purificación de fragmentos de PCR.....	44
4.10.- Cuantificación del RNA vírico.....	44
4.10.1.- Cuantificación de moléculas de RNA totales.....	44
4.10.2.- Cuantificación de moléculas de RNA de polaridad positiva y negativa.....	45
4.11.- Clonaje molecular.....	49
4.11.1.- Mutagénesis dirigida en un clon infeccioso de VFA.....	49
4.11.2.- Clonaje molecular para obtener clones infecciosos quiméricos.....	52
4.11.3.- Clonaje molecular para obtener un RNA correspondiente a la región 3D del VFA de polaridad negativa.....	54
4.12.- Transcripción de plásmidos.....	55
4.13.- Transfección de células BHK-21.....	55
4.14.- Secuenciación de DNA.....	56
4.15.- Tratamiento de las células R con ribavirina.....	56
4.16.- Análisis de los niveles intracelulares de NTPs en células BHK-21 y células R.....	56
4.17.- Determinación de la eficacia biológica relativa (“fitness”) de H ⁵ ₀ y VR100.....	58
4.18.- Disoluciones y tampones.....	59

5.- Resultados	61
5.1.- Establecimiento de dos nuevas líneas celulares independientes persistentemente infectadas por VFA	61
5.2.- Crisis de efecto citopático de las células R	63
5.3.- Alteraciones morfológicas y de crecimiento de las células R	63
5.3.1.- Cambios morfológicos en las células R	63
5.3.2.- Aumento del índice de crecimiento y disminución de la inhibición por contacto	65
5.4.- Evolución de la infectividad durante la persistencia	66
5.5.- Evolución de la proporción de moléculas de RNA vírico de polaridad positiva y negativa durante la persistencia	67
5.5.1.- Diseño de la estrategia de cuantificación de moléculas de RNA específico de banda	67
5.5.2.- El RNA celular no interfiere en la cuantificación del RNA vírico intracelular	68
5.5.3.- Ausencia de interferencia de moléculas de RNA positivas en la cuantificación del RNA de cadena negativa	69
5.5.4.- Cuantificación de moléculas de RNA positivas y negativas de VFA (no persistente)	70
5.5.5.- Cuantificación de moléculas de RNA positivas y negativas durante la persistencia de VFA en células BHK-21	72
5.5.6.- Comprobación del pico de moléculas de RNA de cadena positiva del pase 45	74
5.5.7.- Origen celular o vírico del factor que mantiene el nivel de cadenas negativas superior al de positivas	76
5.5.8.- Cuantificación de moléculas de RNA de polaridad positiva y negativa de virus R de los pases 45, 60 y 100 de la anterior infección persistente	79
5.6.- Termosensibilidad de los virus R	80
5.7.- Virulencia de los virus R para células BHK-21	82
5.8.- Evolución de la capacidad replicativa (“fitness”) de virus R	84
5.9.- Análisis de las secuencias de virus R	84
5.10.- Curación de células R con ribavirina (Rb) y por dilución	87

5.11.- Resistencia a infección con C-S8c1 y MARLS de células R curadas con ribavirina.....	88
5.12.- Ausencia de componentes en el medio de cultivo de células R100 que interfieren con la infección de células BHK-21 por C-S8c1.....	90
5.13.- Determinación de los niveles de NTPs de las células R.....	91
5.14.- Intentos de establecimiento de persistencia por un virus de baja eficacia biológica.	93
5.15.- Ausencia de correlación entre “fitness” y capacidad de matar células BHK-21.....	94
5.16.- Mapeo de determinantes de virulencia en H ⁵ ₉₅	96
5.16.1.- Determinación de la secuencia del genoma de H ⁵ ₉₅	96
5.16.2.- Identificación de mutaciones implicadas en virulencia de H ⁵ ₉₅	101
5.16.3.- Virulencia de virus quiméricos H ⁵ ₉₅ /C-S8c1.....	102
5.17.- La proteína no estructural 2C es un determinante de la virulencia de VFA en células BHK-21.....	110
5.18.- La introducción de la proteína no estructural 2C de C-S8c1 en el contexto de secuencia de H ⁵ ₉₅ reduce la virulencia de H ⁵ ₉₅	114
5.19.- Virulencia de VFA en el establecimiento de persistencia.....	116

6.- Discusión..... 119

6.1.- Coevolución del virus y las células durante la persistencia del VFA en células BHK-21.....	119
6.2.- Repetición de acontecimientos en la evolución vírica.....	120
6.2.1.- Principales características de las células R.....	120
6.2.2.- Principales características fenotípicas y genotípicas de los virus R.....	121
6.3.- Proporción de moléculas de RNA de polaridad positiva y negativa.....	123
6.3.1.- Reducción de moléculas de RNA de polaridad positiva asociada a persistencia: posible contribución al mecanismo molecular de persistencia.....	123
6.3.3.- Regiones del genoma viral implicadas en regulación de síntesis de RNA de polaridad positiva y negativa.....	124
6.4.- Evolución de la virulencia y la capacidad replicativa (“fitness”) durante la persistencia.....	125
6.4.1.- Evolución de la virulencia de los virus R.....	125
6.4.2.- Evolución de la capacidad replicativa (“fitness”) de los virus R.....	126
6.5.- Relación entre virulencia y capacidad replicativa (“fitness”).....	127

6.5.1.- Los determinantes de virulencia de VFA en BHK-21 son multigénicos.....	129
6.5.2.- Modelo para la pérdida de correlación entre virulencia y “fitness”.....	130
6.6.- Implicaciones para modelos de virulencia y diseño de vacunas.....	131
7.- Conclusiones.....	133
8.- Bibliografía.....	135

Summary

1.- Resumen en inglés (Summary).

RNA viruses are the most abundant viruses in nature. Their adaptation is based on the continuous generation of mutant genomes, resulting in extremely heterogeneous and dynamic mutant swarms, termed viral quasispecies. We have used foot-and-mouth disease virus (FMDV) as a model to study the structure, dynamics and adaptive potential of viral quasispecies.

The picornavirus FMDV usually causes an acute, systemic infection *in vivo*, and cytopathic infection in cell culture. The virus can, however, persist asymptotically in the epithelium of the soft palate and oropharynx of ruminants. In the 1980's our laboratory established and characterized a BHK-21 cell line persistently infected with FMDV. In this Doctoral Thesis we have re-examined persistence of FMDV in BHK-21 cells by establishing again two parallel lineages of persistent cultures, beginning with the same stocks of cells and the same clone of FMDV. We report that the pattern of co-evolution of cells and virus was very similar to that described previously. Relative quantitation of both positive and negative FMDV RNA strands has revealed an imbalance in the proportion of positive versus negative strand RNA in the persistently infected cells, that is a property of the virus with some participation of the cells, and which could contribute to the molecular mechanism of persistence.

We also describe the behavior of a FMDV clone (H^{5}_{95}) which has a history of repeated serial plaque-to-plaque transfers in BHK-21 cells, that attained a very low fitness value relative to its parental reference virus (C-S8c1), and yet, its virulence for BHK-21 cells was significantly higher than that of its parental clone. A comparative study of the capacity to kill BHK-21 cells of chimeric FMDVs constructed with cDNA copies of the two parental FMDVs (H^{5}_{95} y C-S8c1) and mutant FMDVs C-S8c1 containing the mutations found in gene 2C of H^{5}_{95} , indicates that the enhanced virulence for BHK-21 cells of the low fitness clone is a polygenic trait, and that non-structural protein 2C is a virulence determinant for FMDV. We provide direct evidence that viral fitness and capacity to kill cells can be either linked or unrelated traits, and that such disparate relationship depends on the evolutionary history of the virus. This has a number of implications for viral pathogenesis, and the existence of specific mutations that affect differentially fitness and virulence opens the way to engineer candidate attenuated vaccine strains unable to kill the host while maintaining replicative competence.

Introducción

2.- Introducción

2.1.- Variabilidad genética de virus RNA. Cuasiespecies víricas.

2.1.1.- Bases moleculares de la variabilidad genética de virus RNA

Los virus que poseen RNA como material genético son los más abundantes en la biosfera, constituyendo más del 70% de los virus patógenos que infectan organismos superiores. Son los causantes de un gran número de enfermedades en el hombre como gripe, sarampión, varias formas de hepatitis, poliomielitis, SIDA, enfermedades de gran importancia veterinaria como la fiebre aftosa (FA), y otras denominadas “emergentes” como las fiebres hemorrágicas asociadas a hantavirus, arenavirus o filovirus (Morse 1994; Nichol y cols. 1993; Duarte y cols. 1994b; Murphy 1994; Murphy y Nathanson 1994; Weaver 1998).

Una característica importante de los virus RNA es su elevada variabilidad genética. Esta alta variabilidad se debe a procesos de recombinación (especialmente frecuentes en virus RNA de polaridad positiva) (King y cols. 1982; Lai 1992), a reordenamientos génicos en virus de genoma segmentado (Webster 1999), y a las elevadas tasas de mutación durante la replicación (Batschelet y cols. 1976; Drake 1993; Drake y Holland 1999). Los valores de tasa de mutación en la replicación de virus RNA se han estimado en 10^{-3} a 10^{-5} errores por nucleótido copiado (Holland y cols. 1982; Domingo y cols. 2001; Domingo 2006), un valor muy superior a los 10^{-8} a 10^{-11} errores por nucleótido copiado estimados para los procesos normales de replicación de DNA celular (Kunkel y Alexander 1986; Drake 1991; Echols y Goodman 1991). La base molecular de la baja fidelidad de copia durante la replicación RNA viral es la ausencia de actividad correctora de errores de las replicasas de RNA (actividad exonucleasa 3'→5'), documentada tanto por métodos bioquímicos (Steinhauer y cols. 1992; Coffin y cols. 1997) como por comparación de dominios estructurales de replicasas de RNA y polimerasas de DNA celulares (Hansen y cols. 1997; Bressanelli y cols. 1999; Ferrer-Orta y cols. 2006).

Como consecuencia de su elevada variabilidad genética, las poblaciones de virus RNA son distribuciones dinámicas complejas de mutantes diferentes aunque muy relacionados entre sí. Estas distribuciones se denominan cuasiespecies virales (Figura 2.1.) y los mutantes que las componen están sometidos a un continuo proceso de

variación genética, competición y selección. El concepto teórico de cuasiespecies fue propuesto inicialmente por Eigen, Schuster y sus colaboradores como un nuevo modelo de evolución molecular para describir la estructura poblacional y adaptabilidad de replicones primitivos (Eigen 1971; Eigen y Schuster 1979; Eigen y cols. 1988; Biebricher y Eigen 2006). Las primeras demostraciones de la organización en cuasiespecies de virus RNA fueron la del fago Q β , la del virus de la fiebre aftosa (VFA) y la del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Domingo y cols. 1978; Domingo y cols. 1980; Holland y cols. 1982; Sobrino y cols. 1983). Hasta el momento, los virus RNA examinados a nivel poblacional muestran un complejo espectro de mutantes y evolucionan tal como predice la dinámica de cuasiespecies (Domingo 1999; Domingo y cols. 2001; Domingo y cols. 2003; Figlerowicz y cols. 2003; Domingo 2006).

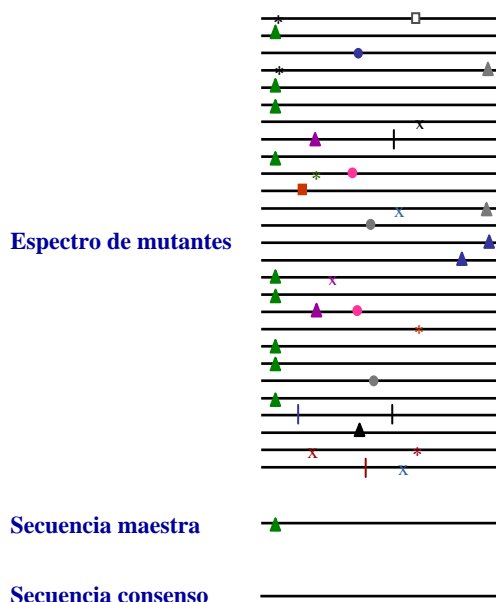


Figura 2.1. **Esquema de la estructura en cuasiespecies de los virus RNA.** Se representa una distribución heterogénea de genomas, típica de los virus RNA. Las líneas representan genomas virales y los símbolos sobre las líneas representan mutaciones. Debajo del espectro de mutantes se indica la secuencia maestra y la secuencia consenso o promedio de la distribución.

Las cuasiespecies virales se representan mediante una secuencia consenso y un espectro de mutantes (Figura 2.1.). La secuencia consenso es la que presenta en cada posición el nucleótido más frecuente en el conjunto de genomas de la población y puede no estar representada en el espectro de mutantes de la población. Las cuasiespecies estables suelen estar dominadas por una secuencia más frecuente en el espectro de mutantes, de mayor eficacia biológica, que se denomina secuencia maestra y que puede o no coincidir con la secuencia consenso (Biebricher y Eigen 2006).

2.1.2.- Evolución de las cuasiespecies virales

La evolución de las cuasiespecies víricas está dirigida por la selección positiva, que promueve la imposición de los variantes más ventajosos para un determinado entorno, por la selección negativa, que elimina o mantiene en baja proporción los mutantes menos aptos de la población, y por efectos de deriva genética, por los que un variante puede ser amplificado y llegar a ser dominante, independientemente de su eficacia biológica (Domingo y Holland 1994; Domingo 2006). Las perturbaciones en las distribuciones de mutantes que replican en hospedadores infectados constituyen la primera etapa en el proceso de diversificación de un virus en la naturaleza. La velocidad de evolución mide los cambios en la secuencia consenso de poblaciones virales en función del tiempo y se suele expresar en sustituciones en el genoma viral por nucleótido y año (Domingo y Holland 1994; Domingo 2006).

Las altas de mutación durante la replicación viral no implican necesariamente una evolución rápida (Domingo y cols. 1978; Holland y cols. 1982; Steinhauer y cols. 1989; Domingo y Holland 1994). Durante la evolución de virus RNA es posible mantener un espectro de mutantes complejo sin variación en la secuencia consenso (estado de equilibrio poblacional) (Domingo y cols. 1978; Steinhauer y cols. 1989; Formella y cols. 2000; Albiach-Marti y cols. 2000). En algunos casos se puede producir una alternancia de periodos de estabilidad de secuencias consenso (estasis evolutiva) con periodos de rápida evolución, como ocurre con algunas estirpes del virus de la gripe tipo A que replican y evolucionan muy lentamente en el intestino de aves acuáticas, pero rápidamente cuando el virus infecta a mamíferos (Gorman y cols. 1992; Webster y cols. 1992; Horimoto y cols. 1995; Webster 1999). Estas observaciones demuestran que la alta heterogeneidad de las poblaciones víricas no es el único factor determinante de la velocidad de evolución de los virus RNA y que otros factores (epidemiológicos, ambientales, etc.) afectan de forma decisiva su velocidad de evolución.

2.1.3.- Eficacia biológica relativa de virus (“fitness”)

Se denomina eficacia biológica (“fitness”) al grado de adaptación de un organismo a su entorno. Para los virus RNA, se ha definido la eficacia biológica como su capacidad para producir progenie infecciosa en un determinado ambiente (Holland y cols. 1991; Martínez y cols. 1991; Domingo y Holland 1997; Domingo y cols. 2003;

Quiñones-Mateu y cols. 2006). Esta aproximación permite establecer valores de eficacia biológica relativa realizando experimentos de competición mediante infecciones con mezclas de dos virus que se distinguen fenotípica o genotípicamente. El valor de eficacia biológica siempre es relativo a un virus de referencia y se refiere a un contexto ambiental definido.

Los clones de una cuasiespecie suelen presentar un valor de “fitness” inferior al de la población en su conjunto (Domingo y cols. 1978; Duarte y cols. 1994a). Así, la selección de mutantes virales a partir de una población generará, en principio, subpoblaciones virales de menor eficacia biológica. Un ejemplo es la dramática pérdida de eficacia biológica que se produjo en el VFA cuando se seleccionaron mutantes resistentes a anticuerpos policlonales (Borrego y cols. 1993). Por tanto, el comportamiento de una cuasiespecie, en cuanto a eficacia biológica, no es el resultado de la eficacia media de sus componentes, sino que la población viral en su conjunto se convierte en la unidad de selección sobre la que actúan las presiones selectivas externas (Eigen 1993, 1996; Eigen y Biebricher 1988; Domingo y cols. 2001; Borrego y cols. 1993; Baranowski y cols. 2000; Ruíz-Jarabo y cols. 2000, 2002; Miller y Larder 2001; Pariente y cols. 2003; Pfeiffer y Kirkegaard 2003, 2005; Vignuzzi y cols. 2006).

La evolución de cada mutante dentro de una cuasiespecie puede estar condicionada por el espectro de mutantes que le rodea. Experimentos con el VSV pusieron de manifiesto que un clon mutante de alta eficacia biológica dentro de una cuasiespecie sólo pudo llegar a imponerse cuando su frecuencia superó un valor mínimo; si su frecuencia era inferior a un valor umbral, el mutante era suprimido por el espectro de mutantes circundante (de la Torre y Holland 1990). Se han documentado otros casos de supresión de mutantes individuales por el espectro de mutantes tanto *in vivo* como en cultivos celulares (Domingo 2006).

Un factor determinante en la ganancia o pérdida de eficacia biológica de una cuasiespecie es el tamaño de la población viral replicante (Chao 1990; Duarte y cols. 1992; Novella y cols. 1995a, b; Elena y cols. 1996; Escarmís y cols. 1996, 1999; Baranowski y cols. 1998; Sevilla y cols. 1998; Yuste y cols. 1999; Arias y cols. 2004; revisión en Domingo y cols. 2003 y Escarmís y cols. 2006) (Figura 2.2.).

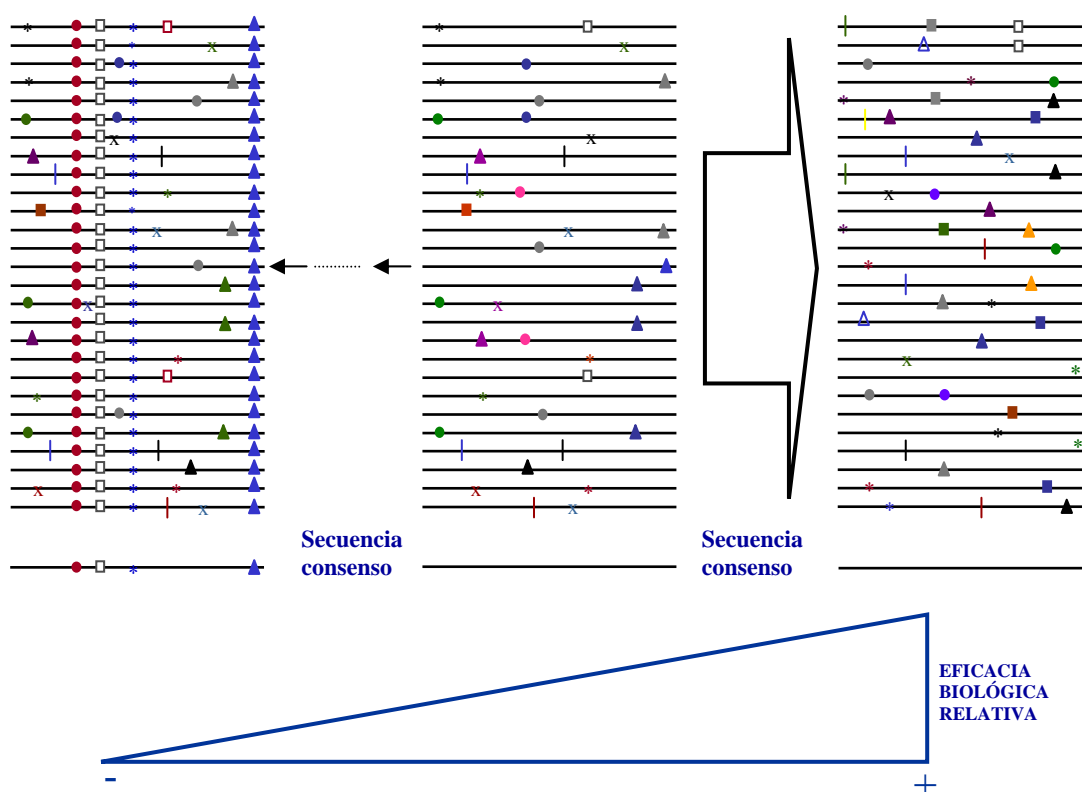


Figura 2.2. **Variación de la eficacia biológica en función del tamaño de la población replicante.**

Se representa una cuasiespecie inicial en el centro, la cual puede evolucionar hacia aumentos de eficacia biológica (flecha ancha) al ser sometida a pases con grandes tamaños poblacionales, o hacia disminuciones de eficacia biológica (flechas pequeñas) al ser sometida a cuellos de botella poblacionales sucesivos o pases placa a placa. Las líneas representan genomas virales y los símbolos sobre las líneas representan mutaciones. Las secuencias consenso se muestran debajo de los correspondientes espectros de mutantes. Los pases con grandes tamaños poblacionales favorecen una optimización de la población viral con el consiguiente incremento de la eficacia biológica relativa del virus, mientras que los pases placa a placa dan lugar a una acumulación de mutaciones deletéreas y una bajada de la eficacia biológica relativa del virus, como se representa en el triángulo de la parte inferior de la figura. (Esquema basado en numerosos estudios revisados en Domingo y cols. 2001; Domingo 2006).

Cuando el tamaño poblacional que participa en la siguiente ronda de replicación es muy reducido respecto al tamaño total disponible, se produce la amplificación de subpoblaciones de genomas independientemente de su adaptación o ventaja selectiva en el entorno, lo que puede dar lugar a la fijación de genomas con mutaciones en la secuencia consenso de la población viral. La repetición seriada de clonajes biológicos

(pases en cuello de botella o placa a placa) limita la selección positiva de variantes con mayor eficacia biológica, reduce las posibilidades de que los virus progenie debilitados sean eliminados por selección negativa y de que las secuencias de mayor eficacia biológica sean rescatadas por recombinación, dominando un proceso de deriva genética que conduce a la acumulación gradual de mutaciones y a una reducción del “fitness” viral. Este proceso se conoce como trinquete de Muller (Muller 1964). La actuación del trinquete de Muller se ha demostrado experimentalmente con el bacteriófago $\Phi 6$ (Chao 1990), el VSV (Duarte y cols. 1992; Clarke y cols. 1993), el VFA (Escarmís y cols. 1996, 1999, 2002; Lázaro y cols. 2002, 2003; revisión en Escarmís y cols. 2006) y el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (Yuste y cols. 1999, 2000). Los datos experimentales obtenidos con el VFA muestran que la bajada de eficacia biológica sigue un patrón bifásico y fluctuante y alcanza un valor basal a partir del cual el “fitness” se estabiliza. La población es resistente a la extinción a pesar de que la acumulación de mutaciones en el genoma es constante (Escarmís y cols. 2002; Lázaro y cols. 2002).

En el caso de infecciones con elevado tamaño poblacional de virus en un ambiente constante, la selección positiva de los variantes más eficaces que se generan durante la replicación permite la ganancia de eficacia biológica (Novella y cols. 1995a; Escarmís y cols. 1999). La dinámica de las cuasiespecies víricas en relación con los cambios de eficacia biológica se ha documentado con numerosos estudios adicionales empleando virus bacterianos, virus animales y virus de plantas (Domingo y cols. 2001; Domingo 2006).

2.1.4.- Implicaciones biológicas de la estructura en cuasiespecies

Las cuasiespecies víricas representan importantes reservorios de variantes, no sólo por la cantidad existente en el espectro de mutantes de la población, sino también por el potencial para generar nuevos mutantes durante la replicación viral. Esta característica de la estructura en cuasiespecies, que fue destacada tanto en los estudios teóricos (Eigen 1971; Eigen y Schuster 1979) como en las primeras descripciones de virus como cuasiespecies (Domingo y cols. 1985; Domingo y Holland 1988; Wimmer y cols. 1993), parece ser clave en fenómenos relevantes desde el punto de vista biológico como cambios de tropismo, alteraciones de la virulencia o de la antigenicidad, escape a

anticuerpos o células citotóxicas, resistencia a agentes antivirales, e incluso en la emergencia o reemergencia de enfermedades víricas (Duarte y cols. 1994b; Forns y cols. 1999; Domingo y cols. 2001a, b, 2003; Figlerowicz y cols. 2003; Domingo 2006).

La rápida evolución de los virus RNA puede permitir el escape del virus a una respuesta del sistema inmune, obligando a la actualización de vacunas para prevenir la enfermedad causada por sucesivas variantes virales (Webster y cols. 1982; Domingo y cols. 1997; Lemon 1997a, b). La existencia de múltiples variantes antigénicas dentro de una misma cuasiespecie vírica se ha puesto de manifiesto en virus como el de la gripe (Both y cols. 1983), el virus de la hepatitis C (Weiner y cols. 1992), el virus de la hepatitis B (Carman y cols. 1990, 1993; Fujii y cols. 1992), el VIH-1 (Reitz y cols. 1988; Masuda y cols. 1990; Broliden y cols. 1991; Rowlands-Jones y cols. 1992; Borrow y cols. 1997) y el VFA (Rowlands y cols. 1983; Mateu y cols. 1988, 1990, 1995; Borrego y cols. 1993; Domingo y cols. 1990), entre otros muchos. El escape de virus a una respuesta previa del sistema inmune puede permitir la progresión de la infección en el organismo, el establecimiento de persistencia y puede obligar a actualizar la composición de vacunas (Domingo y cols. 1997; Webster 1999; Ciurea y cols. 2000; Bowen y Walker 2005).

Otra de las consecuencias biológicas de la alta mutabilidad de los virus RNA es la selección de mutantes resistentes a agentes antivirales (revisiones en Domingo y Holland 1992; Domingo y cols. 1997, 2001a, b). En ocasiones, la resistencia a un agente antiviral implica un solo cambio de aminoácido, como en el caso de la resistencia del virus de la gripe a 4-guanidinio-Neu5Ac2en, que se ha asociado a un cambio de aminoácido en la neuraminidasa viral (Blick y cols. 1995; Staschke y cols. 1995), el caso de la proteína VP1 de rinovirus (Heinz y cols. 1989), o el caso de la resistencia del virus de la diarrea bovina vírica al V32947, que se ha asociado a un cambio de aminoácido en la polimerasa NS5B (Baginski y cols. 2000). En el caso del VIH-1, la creciente dominancia de virus mutantes resistentes a distintos inhibidores, generalmente asociada a pocos cambios de aminoácido en la retrotranscriptasa o la proteasa virales, está dificultando seriamente el tratamiento del SIDA (Larder 1994; Richman 1994; Coffin 1995; Domingo y cols. 2001b). Debido a la gran capacidad de los virus RNA de generar mutantes resistentes a agentes antivirales individuales, se están empleando en la actualidad terapias combinadas como la terapia antiviral altamente activa (HAART) para tratar infecciones por el VIH-1 para intentar evitar el escape del virus (Ho 1995; Furtado y cols. 1999).

Se pueden producir alteraciones o expansiones del tropismo celular como consecuencia de pocos cambios de aminoácido en proteínas víricas (Baranowski y cols. 2001a, 2003). Mutantes capaces de utilizar receptores alternativos o formas alteradas de un receptor celular se han descrito para varios sistemas virales. Uno de los ejemplos más dramáticos es el VIH-1. Ciertos mutantes de este virus pueden pasar de usar únicamente el co-receptor CCR5 a utilizar también el CXCR4, o el CXCR4 de forma exclusiva, por cambio de un aminoácido en la glicoproteína gp120 (De Jong y cols. 1992; Fouchier y cols. 1995; Wang y cols. 1998). Esta alteración se corresponde con el paso de un fenotipo no sincitial a otro sincitial generalmente asociado a la progresión a SIDA (Schuitemaker y cols. 1992; Björndal y cols. 1997; revisión en Berger y cols. 1999). Además, cambios que confieren al bucle V3 de la gp120 un carácter básico permiten al VIH-1 utilizar glicosaminoglicanos como factores de adhesión a las células, lo que aumenta diez veces la producción viral (Zhang y cols. 2002). Se han descrito varios casos de uso de receptores alternativos para un virus, como por ejemplo el virus del sarampión (Hsu y cols. 1998, 2001; Tatsuo y cols. 2000) y el VFA (Jackson y cols. 1996; Sa-Carvalho y cols. 1997; Baranowski y cols. 1998, 2000; Fry y cols. 1999; Núñez y cols. 2001), y otros en los que la afinidad de un virus por su receptor queda alterada por cambios de aminoácido en una proteína de superficie del virus, como por ejemplo el virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón (LCMV) (Ahmed y cols. 1991; Matloubian y cols. 1993; Borrow y cols. 1995; Cao y cols. 1998; Sevilla y cols. 2000; Kunz y cols. 2001). Se ha descrito que una mutación que comporta un cambio de aminoácido en la proteína VP1 confiere al virus de la encefalomiocarditis un carácter diabetogénico para ratones (Bae y Yoon 1993), un cambio en el extremo no codificante del virus coxsackie B3 (CVB3) se ha asociado a un aumento de su carácter cardiopático para el ratón (Tu y cols. 1995), dos sustituciones en la proteína de superficie del virus Friend le confieren carácter neuropatogénico en ratones y un tropismo celular extendido (Kai y Furuta 1984; Masuda y cols. 1992; Masuda y cols. 1996a, b), y el carácter hipervirulento de un VFA de serotipo C3 seleccionado en células BHK-21 modificadas, se asoció a dos cambios de aminoácido en la cápsida viral (Escarmís y cols. 1998). Estos ejemplos ilustran cómo una o pocas mutaciones, que por razones estadísticas pueden hallarse representadas en el espectro de mutantes de virus durante su replicación en los hospedadores, pueden ser suficientes para conferir a subpoblaciones de genomas víricos propiedades fenotípicas alteradas con una implicación en patogenicia.

Además de la presencia de mutantes específicos con propiedades alteradas en los espectros de mutantes, la complejidad de la cuasiespecie puede también alterar el comportamiento de un virus. Así, aumentos de virulencia del coronavirus de la hepatitis del ratón se han asociado a la diversidad de la cuasiespecie medida por la proporción de genomas recombinantes y de genomas con mutaciones puntuales (Rowe y cols. 1997). También, parece que una mayor complejidad de la cuasiespecie del virus de la hepatitis C en pacientes crónicamente infectados se corresponde con una menor probabilidad de eliminación del virus mediante tratamiento combinado de interferón α con ribavirina (Pawlowski y cols. 1998; Pawlowski 2000). Un estudio realizado con un mutante de alta fidelidad de poliovirus mostró que el incremento de fidelidad se correspondía con una disminución del “fitness” y la virulencia en ratones (Pfeiffer y Kirkegaard 2005). El mutante de alta fidelidad replicaba a niveles similares al “wild-type”, pero generaba una diversidad genómica menor y era incapaz de adaptarse a condiciones de crecimiento adversas. En animales infectados, la reducción de la diversidad viral conducía a la pérdida del neurotropismo y a un fenotipo patogénico atenuado. La expansión de la diversidad de la cuasiespecie mediante mutagénesis química restauraba el neurotropismo y la patogénesis (Vignuzzi y cols. 2006). Estos resultados establecen una relación directa entre la tasa de mutación, la complejidad del espectro de mutantes y la patogenia.

2.2.- La fiebre aftosa

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad muy contagiosa que afecta a animales de pezuña hendida, fundamentalmente a ganado bovino y porcino, y cuyo agente causal es el virus de la fiebre aftosa (VFA). Es la enfermedad animal que ocasiona las pérdidas económicas más importantes a nivel mundial, debido a descensos de la producción ganadera, a las restricciones en el movimiento de ganado y de sus productos derivados, al cierre de mercados, a los gastos de vacunación, al sacrificio de animales infectados y de aquellos que han estado en contacto con ellos y a otras repercusiones económico-sociales de los brotes de la FA (revisiones en Sobrino y cols. 2001; Sobrino y Domingo 2004).

La FA es una enfermedad enzoótica en muchas regiones de África, Asia, América del Sur y Europa del Este. Se puede obtener información actualizada sobre la situación de la FA en el mundo en la página web de la Oficina Internacional de

Epizootias (OIE): www.oie.int/es_index.htm. Existen múltiples vías de transmisión del virus, incluidas el contacto directo, transporte mecánico, aerosoles, ingestión, etc. El virus penetra en el organismo a través de los epitelios y produce vesículas o aftas causando una infección aguda caracterizada por fiebre y aftas, principalmente en lengua, boca y pezuñas. En animales adultos afectados de la enfermedad vesicular típica, la mortalidad no suele superar el 5% (Timoney y cols. 1988; Domingo y cols. 1990), mientras que en animales jóvenes afectados de miocarditis asociada al VFA, la tasa de mortalidad se aproxima al 50%. Tras la fase aguda de la enfermedad se puede establecer una infección persistente en rumiantes en la que el virus persiste de forma asintomática en el esófago y garganta por periodos prolongados de tiempo. Estos animales portadores asintomáticos constituyen una reserva natural de virus muy extendida en todo el mundo y se sospecha que pueden originar nuevos brotes de la enfermedad aguda en animales sanos, dificultando aún más el control de la enfermedad (van Bakkum y cols. 1959; Pereira 1981; Gebauer y cols. 1988; Salt 1993, 2004). En los últimos años se han registrado casos de brotes de FA en países que se consideraban libres de la enfermedad como en Taiwan (Dunn y Donaldson 1997), Japón (Boletín OIE nº 13, vol. 13, año 2000), Grecia (Boletín OIE nº 13, vol. 26, año 2000) o el Reino Unido (Ferguson y cols. 2001; Giles 2001; Goodman 2001; Picrell y Enserink 2001; Samuel y Knowles 2001; Sobrino y Domingo 2001). En la actualidad no existe ninguna zona del mundo que pueda considerarse a salvo de las repercusiones directas o indirectas de los brotes de FA (Rowlands 2003).

2.3.- El virus de la fiebre aftosa

El VFA pertenece al género aftovirus de la familia *Picornaviridae*, y como tal posee un genoma RNA de cadena simple y de polaridad positiva, carece de envuelta, y su cápsida es de simetría icosaédrica (sección 2.3.2.). Se han descrito siete serotipos distintos del VFA (A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2 y SAT3), más de 65 subtipos y numerosos variantes antigénicos (Pereira 1977; Mateu y cols. 1988). Esta grandísima diversidad antigénica es un reflejo de la alta variabilidad genética del VFA y constituye uno de los principales obstáculos para el control de la enfermedad por vacunación (Domingo y cols. 1980, 1990, 1992; Barteling y Woortmeyer 1987; Domingo 1989; Domingo y Holland 1992; Sobrino y Domingo 2004).

2.3.1.- Organización genómica y proteínas codificadas por el virus de la fiebre aftosa

El virus de referencia empleado en nuestro laboratorio es el C-S8c1, un clon biológico obtenido a partir de un virus proveniente de un cerdo enfermo, aislado en Sta. Pau, Girona, en 1970 (virus C-Sta Pau Spain/1970). Pertenecce al subtipo europeo C₁ dentro del serotipo C. El genoma del VFA C-S8c1 tiene 8115 nucleótidos de longitud, sin contar los tramos homopoliméricos de polirribocitidilato (poliC) y poliadenilato (poliA), que son heterogéneos en longitud (Escarmís y cols. 1992, 1996; Toja y cols. 1999) (Figura 2.3.). El genoma de C-S8c1 se divide en una región central que contiene un único marco de lectura abierta comprendida entre los nucleótidos 1039 y 8023, y dos regiones más cortas no codificantes (5' UTR y 3' UTR), situadas en los extremos de la molécula de RNA y que incluyen elementos reguladores con complejas estructuras secundarias y terciarias (Flint y cols. 2004; Martínez-Salas y cols. 2002). La región 5' no codificante comprende los primeros 1038 nucleótidos del genoma y la región 3' no codificante está situada entre los nucleótidos 8024 y 8115 (en esta numeración se excluyen los tramos homopoliméricos).

2.3.1.1.- Región 5' no codificante

Esta región reguladora se divide en varias subregiones, que en el sentido 5' al 3' son: el fragmento S, el poliC, la zona de pseudonudos, un elemento replicativo que actúa en cis ("cis acting replication element" o cre) y el IRES (sitio interno de entrada de ribosomas). El fragmento S, de 367 nucleótidos, está muy estructurado y se encuentra muy conservado entre distintos VFAs (Escarmís y cols. 1992; Belsham 1993). A continuación se encuentra un tramo de poliC, de función desconocida, con una longitud variable de 100 a 400 nucleótidos, que se encuentra también presente en cardiovirus pero no en otros picornavirus. Adyacente al poliC existe una región que contiene una serie de repeticiones de una estructura terciaria de pseudonudos (Pleij y cols. 1985), de función desconocida (Escarmís y cols. 1995). Posteriormente, se encuentra el elemento cre que tiene una función importante en replicación (Mason y cols. 2002). Precediendo a los AUGs iniciadores se halla una región de 435 nucleótidos

denominada IRES cuya estructura secundaria está bien definida y conservada y que permite la entrada del ribosoma para la iniciación interna de la síntesis de la poliproteína viral de una forma independiente de *cap* (Pelletier y Sonenberg 1988; Jang y cols. 1990; Kuhn y cols. 1990; Belsham y Sonenberg 1996; Ramos y Martínez-Salas 1999; Martínez-Salas y cols. 2001; Sarnow 2003).

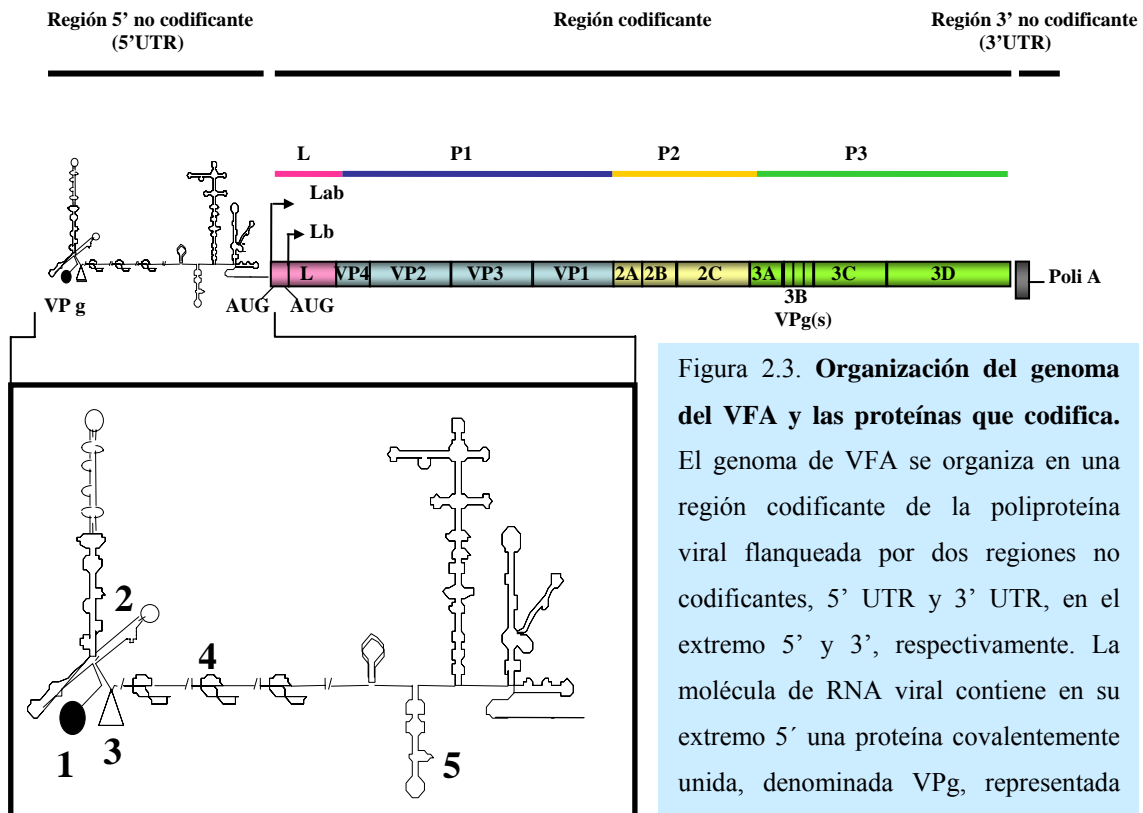


Figura 2.3. Organización del genoma del VFA y las proteínas que codifica.

El genoma de VFA se organiza en una región codificante de la poliproteína viral flanqueada por dos regiones no codificantes, 5' UTR y 3' UTR, en el extremo 5' y 3', respectivamente. La molécula de RNA viral contiene en su extremo 5' una proteína covalentemente unida, denominada VPg, representada por un círculo negro (1). A continuación

se localizan el fragmento S, altamente estructurado (2), el poliC (3), la zona de pseudonudos en tándem (4) y el sitio de entrada del ribosoma independiente de CAP (IRES) (5). Las estructuras secundarias están basadas en varios análisis estructurales y predicciones de modelado molecular (Pilipenko y cols. 1989; Escarmís y cols. 1992; Martínez-Salas y cols. 1993). En la región 5' no codificante se indican los dos AUGs iniciadores de la traducción. Tras el procesamiento de la poliproteína viral se generan los genes estructurales (P1) y no estructurales (P2 y P3). La región 3B codifica tres copias de VPg, la proteína unida covalentemente al extremo 5' del RNA (círculo negro en la región 5' no codificante). (Basado en Belsham 1993; Racaniello 2001).

2.3.1.2.- Región codificante

La mayor parte del genoma de VFA es una zona de lectura abierta de 6984 nucleótidos que codifica una poliproteína de 2328 aminoácidos que es procesada por las proteasas virales durante el ciclo infeccioso. La lectura del RNA puede comenzar en cada uno de los dos codones AUG funcionales situados inmediatamente después del IRES y separados entre sí por 84 nucleótidos. La poliproteína está dividida en 4 regiones, que del extremo amino(N)-terminal al carboxilo(C)-terminal, se denominan: L, P1, P2 y P3 (Figura 2.3.).

La región L (“leader”) codifica las proteínas Lab y Lb, según comience la lectura en el primer o segundo AUG funcional (Devaney y cols. 1988). Lab es 28 aminoácidos más larga que Lb aunque ambas formas parecen ejercer la misma función en cultivos celulares (Medina y cols. 1993). L es una proteasa activa en *cis* y *trans* que cataliza su propia separación de la poliproteína e inicia la proteólisis del componente celular p220 del factor de iniciación de la traducción eIF4F (componente del complejo proteico de unión al *cap* de los RNA mensajeros celulares), lo que conduce a una parada (“shut off”) de la síntesis de proteínas celulares en las células infectadas (Devaney y cols. 1988; Glaser y Skern 2000). Aparentemente, la proteasa L no es necesaria para la replicación viral del VFA en cultivos celulares (Piccone y cols. 1995a). Estudios recientes han revelado que el sitio de inicio Lb es necesario para la infectividad del VFA, mientras que el sitio de iniciación Lab es prescindible (Cao y cols. 1995; Escarmís y cols. 1996, 1999; Arias y cols. 2001, 2004). Los residuos catalíticos esenciales de la enzima han sido identificados (Piccone y cols. 1995b; Roberts y Belsham 1995), y se ha determinado su estructura tridimensional (Guarné y cols. 1998).

La región P1 codifica las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4. La distribución de estas proteínas en la cápsida se describe en la sección 2.3.2.

La región P2 codifica las proteínas no estructurales 2A, 2B y 2C. 2A es un péptido de 16 aminoácidos que cataliza en *cis* la escisión de P1-2A de 2BC (Ryan y cols. 1991; Ryan y Flint 1997). En células infectadas con poliovirus, 2B y 2C están localizadas en complejos de replicación asociados a membranas (Bienz y cols. 1987; 1990). La proteína 2B de enterovirus está implicada en permeabilidad de membranas (van Kuppeveld y cols. 1997), y en el bloqueo de la secreción de proteínas (Doedens y

Kirkegaard 1995). La proteína 2C de poliovirus contiene motivos de unión a membranas, de inducción de vesículas y de unión a RNA, y actúa en la replicación del RNA viral (Argos y cols. 1984; Rodríguez y Carrasco 1993; Tolskaya y cols. 1994; Xiang y cols. 1995a, b; Gromeier y cols. 1999; Pfister y Wimmer 1999) y en la inducción de la proliferación de vesículas de membranas (Bienz y cols. 1990). En la región codificante de la 2C de poliovirus se encuentra un elemento regulador (cre) que actúa en cis (Goodfellow y cols. 2000). 2C incluye dos motivos de unión a nucleótidos trifosfato (NTPs) denominados A y B que poseen actividad ATPasa y GTPasa, y un dominio helicasa denominado C, aunque no se ha demostrado actividad helicasa para ninguna proteína 2C de picornavirus. La actividad ATPasa, especialmente la del motivo B, está relacionada con la inhibición de la replicación viral mediada por cloruro de guanidinio (Pfister y Wimmer 1999; Mason y cols. 2003). Las mutaciones que confieren resistencia a guanidinio mapean en esta proteína tanto en poliovirus (Pincus y cols. 1986; Pincus y Wimmer 1986; Pincus y cols. 1987; de la Torre y cols. 1990), como en el VFA (Saunders y King 1982; Saunders y cols. 1985; Pariente y cols. 2003).

La región P3 codifica las proteínas no estructurales 3A, 3B, 3C y 3D. La proteína 3A de poliovirus está implicada en la síntesis del RNA viral (Takeda y cols. 1986; Gromeier y cols. 1999). 3A podría estar implicada en el anclaje a membrana del complejo de replicación en picornavirus (Xiang y cols. 1998), y contribuir al efecto citopático y a la inhibición de la secreción de proteínas (Doedens y Kirkegaard 1995). También se encuentra implicada en virulencia y rango de hospedador de diferentes picornavirus: cambios de aminoácido en 3A del VFA se han asociado a la adaptación del virus C-S8c1, originalmente de un aislado de cerdo, a cobayas (Núñez y cols. 2001) y a la atenuación en bovinos del VFA de serotipo O (Giraud y cols. 1990; Beard y Mason 2000; O'Donnell y cols. 2001). Sustituciones en la proteína 3A del virus de la hepatitis A permiten la adaptación del virus a cultivos celulares (Morace y cols. 1993; Graff y cols. 1994). 3B incluye tres copias en tándem de la proteína VPg, que está unida covalentemente al extremo 5' del RNA genómico del virus y está implicada en la iniciación de la síntesis de RNA y probablemente también en la encapsidación (Rowlands 1999; Ferrer-Orta y cols. 2006a). El VFA es el único picornavirus que codifica tres copias de 3B y no se han encontrado aislados naturales con menos de tres copias. Se han construido virus con una y dos copias funcionales en el laboratorio observándose una reducción en la síntesis de RNA y en la capacidad de replicar en

ciertos tipos celulares (Falk y cols. 1992; Mason y cols. 2003). Esta posible relación entre 3B, la síntesis del RNA viral y el potencial patogénico del VFA explicaría por qué se mantiene esta redundancia de 3B que, de no ser importante, podría ser eliminada mediante recombinación homóloga. 3C es una proteasa que cataliza la mayor parte de las roturas hidrolíticas de la poliproteína del VFA, y su secuencia sugiere que se trata de una serín proteasa relacionada con la tripsina. Se ha descrito que la proteasa 3C también es capaz de procesar los factores de iniciación de la traducción eIF4A y eIF4GI (Belsham y cols. 2000). 3D es la RNA polimerasa dependiente de RNA (RpRd) encargada de la replicación del virus (replicasa viral). La estructura tridimensional de la 3D de VFA aislada y en un complejo con RNA molde-iniciador fue determinada por el grupo de la Dra. Nuria Verdaguer en colaboración con nuestro grupo (Ferrer-Orta y cols. 2004). La estructura con el RNA fue la primera resuelta para una polimerasa de picornavirus. Al igual que otras RNA replicasas, la secuencia de 3D del VFA no muestra evidencia de la presencia de un dominio de actividad exonucleasa 3'→5' (actividad correctora de pruebas) y contiene los aminoácidos de la triada catalítica DDD (aminoácidos 240, 338 y 339) típica de las replicasas de virus RNA de polaridad positiva (Hansen y cols. 1997; Ferrer-Orta y cols. 2004, 2006a, b). Varios productos intermediarios del procesamiento de la poliproteína también intervienen en el proceso de replicación del virus (revisiones en Racaniello 2001; Semler y Wimmer 2002; Rowlands 2003). La evidencia actual con proteínas del VFA es que varios precursores y proteínas procesadas son probablemente multifuncionales (revisiones en Rowlands 2003; Sobrino y Domingo 2004).

2.3.1.3.- Región 3' no codificante

La región 3' no codificante posee una longitud de 91 nucleótidos y está implicada en replicación (Mirmomeni y cols. 1997). El extremo 3' está constituido por un tramo de poliadenilato (poliA), de una longitud de 60-90 residuos, típico de un RNA mensajero eucariótico. El RNA del VFA actúa como un RNA mensajero *in vitro* e *in vivo* (revisiones en Belsham 1993; Rowlands 1999, 2003). El poliA interviene en la circularización del genoma, previamente al inicio de la replicación (Herold y Andino 2001), y los residuos de adenilato actúan como molde del iniciador 3B-pUpU, que se une e inicia la síntesis de la cadena negativa del genoma viral.

2.3.2.- Estructura de la cápsida del VFA. Reconocimiento de anticuerpos y receptores celulares

Mediante técnicas de difracción de rayos X sobre cristales de virus se ha resuelto la estructura tridimensional de varios picornavirus, entre ellos distintas estirpes del VFA (Acharya y cols. 1989; Lea y cols. 1995; Curry y cols. 1996), incluido nuestro virus de referencia C-S8c1 (Lea y cols. 1994). La cápsida de VFA mide unos 300Å de diámetro, presenta simetría icosaédrica y está compuesta por 60 copias de cada una de las 4 proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4 (Figura 2.4.). Las tres primeras proteínas están parcialmente expuestas al exterior y comparten una estructura secundaria y terciaria muy similar en forma de barril β con 8 cadenas β antiparalelas que se denominan B, I, D, G, C, H, E, F, y que están conectadas entre sí por bucles de longitud variable que se identifican por las cadenas que unen; VP4 es interna, y se puede considerar como una prolongación N-terminal de VP2.

Una copia de VP1, VP3 y VP0 (VP2 más VP4) se ensamblan formando un protómero biológico. Cinco protómeros se asocian formando un pentámero, y doce pentámeros se unen para formar una cápsida de simetría icosaédrica (Figura 2.4.). La entrada del RNA viral es una señal que induce el autoprocesamiento de VP0 en VP4 y VP2. (Curry y cols. 1996). En un pentámero, los 5 protómeros se relacionan entre sí por un eje de simetría de orden 5 donde las 5 copias de VP1 se disponen rodeando este eje, formando un poro hidrofóbico que permite la entrada de iones voluminosos (como el Cs^+) y de colorantes (como el rojo neutro) que se unen al RNA viral e inactivan fotoquímicamente al virus (Acharya y cols.1989; Díez y cols. 1990; Racaniello 2001).

Algunos de los bucles y láminas de las proteínas de la cápsida del VFA se encuentran expuestos al exterior e interaccionan con anticuerpos. El bucle G-H de la proteína VP1 (aminoácidos 140-160) muestra movilidad en la superficie de la cápsida y contiene uno de los principales determinantes antigénicos del VFA que se ha denominado sitio A (Mateu 1995; Mateu y cols. 1989, 1990), y multitud de mutantes de escape a la neutralización por anticuerpos monoclonales se han aislado en esta región genómica (Mateu y cols. 1989, 1990; Mateu 1995; Perales y cols. 2005). El bucle G-H de VP1 posee varios epítomos solapantes que muestran distinto grado de conservación entre aislados naturales del VFA de serotipo C (Mateu y cols. 1988, 1989, 1990; Martínez y cols. 1992; Borrego y cols. 1995; Mateu 1995).

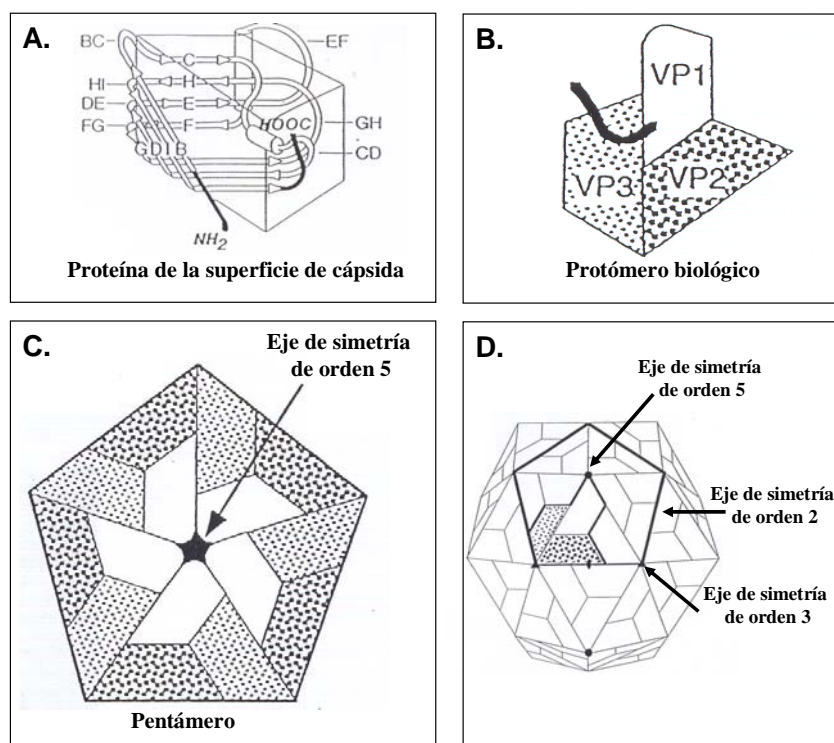


Figura 2.4. Esquema general de la estructura de la cápsida del VFA. A) Estructura terciaria de VP1, VP2 y VP3 en forma de trapezoide. Las cadenas β se representan como flechas, las hélices α como cilindros, los bucles como cintas blancas y los dominios C- y N- terminales como cintas negras. En el esquema se ha delimitado un trapezoide cuya cara superior se encuentra expuesta en la superficie del virión y la inferior está en contacto con el RNA.

B) Posición relativa de las proteínas VP1, VP2 y VP3 formando un protómero biológico. La posición del extremo C-terminal de VP1 se representa con una cinta negra. C) Distribución de las proteínas VP1, VP2 y VP3 en un pentámero alrededor del eje de simetría de orden 5. D) Estructura de la cápsida con indicación de la posición de los ejes de simetría de orden 2, 3 y 5. Se resalta un pentámero y dentro de éste un protómero biológico (Esquemas basados en Hogle y cols. 1985; Acharya y cols. 1989; Rossmann y Johnson, 1989; Mateu, 1995; Sobrino y cols. 2001).

Además del sitio A se han identificado otros determinantes antigénicos del VFA C-S8c1 como el sitio C (extremo carboxi-terminal de VP1) y el sitio D, un complejo formado por epítomos discontinuos implicando a aminoácidos de VP1, VP2 y VP3 (Lea y cols. 1994; Mateu y cols. 1994, 1998; Mateu 1995).

La estructura tridimensional (determinada mediante difracción de rayos X) de complejos entre varios péptidos sintéticos que representaban el bucle G-H de VP1 y el fragmento Fab de varios anticuerpos neutralizantes específicos, mostró que el triplete Arg-Gly-Asp (RGD) (aminoácidos 141-143) situado en la zona más expuesta del bucle G-H de VP1, es esencial para la interacción con los anticuerpos (Verdaguer y cols. 1995, 1996, 1998, 1999; Hewat y cols. 1997; Ochoa y cols. 2000; Sobrino y Domingo 2004). El RGD también está implicado en la interacción con integrinas, proteínas de

adhesión que actúan como uno de los receptores del VFA ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$ y $\alpha_5\beta_1$) (Fox y cols. 1989; Rieder y cols. 1993; Mason y cols. 1994; Beristein y cols. 1995; Jackson y cols. 2000, 2002; Sa-Carvalho y cols. 1997; Baranowski y cols. 2003; Rieder y cols. 2005). Existen evidencias de que la integrina $\alpha_v\beta_6$ actúa como receptor principal *in vivo* (Monaghan y cols. 2005). El RGD tiene una doble función en el ciclo vital del virus en la naturaleza: el reconocimiento de receptores celulares y la interacción con anticuerpos neutralizantes. Esta coincidencia de residuos de aminoácido en estas dos funciones podría promover una coevolución de tropismo y antigenicidad en el VFA, también observada en otros sistemas virales (revisión en Baranowski y cols. 2001a, 2003). Resultados *in vivo* sugieren que la replicación del VFA en bovinos parcialmente inmunizados con péptidos sintéticos promueve la selección de variantes virales con alteraciones en el RGD y aminoácidos adyacentes, que muestran tanto modificaciones antigénicas como de tropismo celular (Taboga y cols. 1997; Tami y cols. 2003).

Poblaciones virales del VFA C-S8c1 pasadas múltiples veces en células BHK-21 pueden prescindir del RGD para su infectividad (Martínez y cols. 1997). En VFAs adaptados a cultivos celulares el heparán sulfato (HS) posee un importante papel en la entrada del virus a la célula (Jackson y cols. 1996; Sa-Carvalho y cols. 1997; Baranowski y cols. 1998; Fry y cols. 1999). También se han aislado mutantes del VFA C-S8c1 que carecen tanto del RGD como de motivos de unión a HS y que dan lugar a progenie infecciosa, sugiriendo la posibilidad de existencia de una tercera vía de entrada en la célula (Baranowski y cols. 2000). Estos resultados en cultivos celulares demuestran que un número limitado de sustituciones de aminoácido en la cápsida del VFA C-S8c1 puede ocasionar una expansión de tropismo celular debido a que el virus puede emplear más de un tipo de receptor (integrinas, HS y una tercera vía no identificada) para entrar, incluso en el mismo tipo de células (Baranowski y cols. 1998, 2000, 2001b, 2003).

2.4.- Traducción y replicación del RNA del VFA

El RNA del VFA es infeccioso, y tras la entrada en el citoplasma de la célula, debe ser traducido para dar lugar a las proteínas virales necesarias para la replicación viral y el ensamblaje del RNA en nuevos viriones. La traducción se produce a partir de un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) (sección 2.3.1.1.), con participación de factores de iniciación de la traducción necesarios para la traducción de los RNAs mensajeros celulares (Pilipenko y cols. 2000). El procesamiento del factor eIF4G por la proteasa L (Martínez-Salas y cols. 2001) (sección 2.3.1.2.) inhibe la síntesis de proteínas dependiente de *cap*, mientras que el producto de corte C-terminal, que permanece asociado a los factores eIF4A y eIF3, es suficiente para mantener la actividad del IRES. De esta forma, se facilita la traducción de los genomas virales que presentan un IRES. El factor eIF4G intacto y el producto de corte C-terminal de eIF4G interactúan con el extremo 3' del IRES del VFA (dominios J-K) (López de Quinto y Martínez-Salas 2000; Stassinopoulos y Belsham 2001). El IRES del VFA también requiere la presencia de otras proteínas celulares que estimulan la actividad del IRES mediante la formación o estabilización de estructuras terciarias del IRES (revisión en Belsham y Sonenberg 1996; 2000).

La proteasa L induce el corte proteolítico de eIF4GI a tiempos muy tempranos postinfección, siendo suficiente un nivel muy bajo de expresión de la proteasa (Belsham y cols. 2000). Las cinéticas de procesamiento proteolítico de eIF4GI y el homólogo eIF4GII, son similares en células infectadas con VFA (Gradi y cols. 1998, 2004). La poliproteína viral se procesa principalmente por la acción de la proteasa 3C, liberándose distintos productos intermediarios de procesamiento y proteínas virales maduras. La proteasa 3C participa además en el procesamiento del factor de la traducción eIF4G contribuyendo a la síntesis de proteínas independiente de *cap* (Belsham y cols. 2000).

Una vez que la poliproteína ha sido procesada para dar lugar a las distintas proteínas virales, el RNA sirve de molde para la síntesis de la cadena complementaria de RNA de polaridad negativa por la RpRd codificada por la región 3D del genoma. Para el inicio de la replicación, la polimerasa 3D utiliza como cebador los péptidos VPg y adiciona un residuo de uridil-monofosfato (UMP) a la Tyr que se encuentra en posición 3 del péptido VPg (Paul y cols. 1998; Paul y cols. 2003; Nayak y cols. 2005; Ferrer-Orta y cols. 2006a). Durante el inicio de la síntesis de la cadena positiva es necesaria la actuación de la región genómica *cre* (elemento de replicación en *cis*),

situado en la región 5' no codificante del genoma, como molde del proceso de uridilación de VPg. Esta reacción es estimulada por la molécula 3CD (Paul y cols. 2000; Yin y cols. 2003; Nayak y cols. 2005, 2006). En cambio, para la iniciación de la síntesis de la cadena negativa no se requiere la presencia de cre (Murray y Barton 2003). Existen evidencias de que el cre del VFA también puede actuar en *trans* (Tiley y cols. 2003).

Se piensa que el proceso de replicación del genoma en picornavirus está asociado a la cara citoplasmática de la membrana del retículo endoplasmático. La polimerasa 3D es reclutada en la membrana por el péptido 3AB (Lyle y cols. 2002b; Paul y cols. 2003). Se ha propuesto un modelo en el que un tapiz de polimerasas estaría recubriendo la membrana externa del retículo endoplasmático de células infectadas (Lyle y cols. 2002a). La eficiencia de la replicación del RNA viral sería mayor al estar compartimentada en la membrana, siendo cada genoma susceptible de ser copiado por diversas polimerasas que constituyen el tapiz.

2.4.1.- Relación entre moléculas de RNA de polaridad positiva y negativa

En células infectadas con poliovirus, la cantidad de RNA genómico de polaridad positiva es unas 30-70 veces superior al RNA complementario de polaridad negativa (Novak y Kirkegaard 1991). Asumiendo que los genomas RNA y sus complementarios poseen estabilidad similar, una posible explicación para este desequilibrio es que las dos cadenas sean sintetizadas por mecanismos diferentes que muestran distinta eficiencia. Los componentes de las células del hospedador desempeñan un papel crítico en la regulación de la cantidad de cadenas positivas y negativas sintetizadas durante la infección con poliovirus (López-Guerrero y cols. 1991). La asimetría, es posible que se deba a que la iniciación de la síntesis en el extremo 3' de la cadena de RNA (+) es más eficiente que la iniciación en el extremo 3' de la cadena de RNA (-). Una demostración elegante de esta hipótesis se obtuvo con la construcción y el estudio de un genoma del virus de la rabia (virus RNA de polaridad negativa) con idénticos sitios de iniciación de la síntesis de RNA en los extremos 3' de ambas cadenas de RNA, (+) y (-). En las células infectadas con este virus, la relación entre las cadenas (+) y (-) fue 1:1, mientras que en células infectadas con el virus "wild-type" la relación era 49:1 (Finke y Conzelmann 1997).

Recientemente, se han puesto a punto técnicas que permiten realizar cuantificaciones específicas de cadenas de RNA de polaridad positiva o negativa empleando PCR a tiempo real (Komurian-Pradel y cols. 2004). Este estudio reveló que el RNA de cadena negativa del virus de la hepatitis C es 100-1000 veces menos abundante que el RNA de cadena positiva en el hígado de pacientes infectados.

En esta Tesis Doctoral se ha aplicado la técnica de PCR a tiempo real a la cuantificación de moléculas de RNA de cadena positiva y cadena negativa del VFA en células infectadas. Ello ha permitido un estudio de la proporción de las moléculas de RNA de las dos polaridades durante la persistencia del VFA en células BHK-21, tal como se describe en Materiales y Métodos (sección 4.10.2.).

2.5.- Infecciones persistentes

2.5.1.- Generalidades

El término “persistencia” se refiere a la supervivencia a largo plazo de los virus en sus hospedadores, y ha sido descrita de diversas formas (revisiones en Oldstone 2006; Ahmed y Chen 1999; Domingo y cols. 1998): 1) supervivencia en una población celular viable, con limitación de la muerte celular y replicación de los genomas virales en equilibrio con la multiplicación de las células hospedadoras; 2) supervivencia en un organismo; 3) supervivencia en la naturaleza mediante la infección continua de organismos hospedadores susceptibles, con o sin persistencia en las células u organismos, y con o sin estabilidad a largo plazo de los virus como partículas libres. Factores genéticos, ecológicos y ambientales ejercen influencia en la persistencia viral. Los mecanismos implicados en el mantenimiento de infecciones persistentes *in vivo* son múltiples y complejos e incluyen la modulación de la expresión génica, tanto del virus como de la célula, y la modificación de la respuesta inmune del hospedador. La continua replicación del virus puede alterar las funciones de las células del hospedador sin destruirlas, promoviendo un desequilibrio en la homeostasis normal del hospedador.

2.5.2.- Persistencia in vivo

Se han distinguido tres tipos principales de infecciones persistentes *in vivo* (Baron 1996; Ahmed y Chen 1999):

1. Infecciones latentes. El virus permanece en el hospedador en una forma no infecciosa, con posibilidad de una reactivación posterior, que puede estar dirigida por varios estímulos, incluyendo cambios en la fisiología celular, superinfección por otros virus, inmunosupresión, etc.
2. Infecciones crónicas. El virus continúa multiplicándose tras la infección primaria y puede dar lugar a enfermedades crónicas o recurrentes.
3. Infecciones lentas. Este tipo de infección se caracteriza por un largo periodo de incubación seguido de la progresión de la enfermedad. A diferencia de las infecciones latentes y crónicas, las infecciones lentas no tienen por qué comenzar con una fase aguda de multiplicación viral.

En las infecciones persistentes, el genoma viral puede permanecer integrado de forma estable en el DNA celular, mantenerse en estado episomal, o con replicación limitada. Algunos virus pueden mantener más de un tipo de infección persistente al mismo tiempo, en diferentes tipos celulares. El tipo de infección persistente puede o no depender del tipo celular y el estado fisiológico de la célula. Por ejemplo, el virus de Epstein-Barr infecta de forma latente células B, pero establece una infección crónica en células epiteliales de la faringe (Miyashita y cols. 1995; Chen y Hudnall 2006).

Las infecciones persistentes de células en cultivo se han clasificado en tres tipos (Baron 1996; Oldstone 2006):

1. Infecciones estacionarias. La mayoría o todas las células en el cultivo están infectadas, hay liberación de virus lenta, pero continua y al muerte celular es nula o mínima. Las células infectadas pueden mostrar morfología alterada y pérdida de inhibición por contacto. La infección no puede “curarse” mediante tratamiento del cultivo con anticuerpos neutralizantes de la infectividad viral. Un ejemplo de este tipo de persistencia es la infección de células de ratón por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), un miembro de la familia *Arenaviridae*. Este virus es, inherentemente, no citopático en su hospedador natural (Sevilla y cols. 2003; Oldstone 2006).
2. Cultivos portadores. Solo una parte de las células del cultivo permanece infectada. Generalmente, aunque no siempre, se mantiene una continua producción de virus infeccioso con muerte de algunas células (Korner y Burgert 1994; Burgert y cols. 2002). A pesar de ello, siempre están presentes células libres de virus, que pueden recuperarse por clonaje. Este tipo de infección persistente puede ser “curada”, eliminando el virus del cultivo, mediante tratamiento con agentes antivirales

(anticuerpos, interferón, inhibidores, etc.). En este tipo de persistencia frecuentemente se encuentran virus con carácter termosensible.

3. Infecciones latentes. El genoma viral replica y es segregado a las células hijas intra o extracromosómicamente (Barreca y O'Hare 2006).

2.6.- Persistencia del VFA

El VFA puede establecer infecciones persistentes asintomáticas en la zona bucofaríngea de los rumiantes después de una infección aguda o como resultado de la vacunación con virus atenuado (revisiones en van Bekkum y cols. 1959; Domingo y cols. 1990; Dawe y cols. 1994; Salt 2004). A partir de animales persistentemente infectados se han aislado virus variantes con cambios genéticos y antigénicos (Costa Giomi y cols. 1984; Gebauer y cols. 1988; Malirat y cols. 1994). Estudios clásicos de transmisión de VFA sugirieron que era improbable que el VFA que persiste en rumiantes pudiera ser el origen de brotes agudos de FA. No obstante, estudios más recientes sobre la epidemiología molecular de VFA en África han proporcionado evidencia de que búfalos persistentemente infectados pueden ser el origen de infección en bovinos y otras especies (Dawe y cols. 1994; Bastos y cols. 2000).

2.6.1.- Persistencia del VFA en cultivos celulares

Los sistemas de persistencia de virus en cultivos celulares pueden revelar mecanismos de persistencia *in vivo* así como servir de modelos para el estudio de variabilidad y evolución de genomas RNA.

La primera observación que permitió el establecimiento de células persistentemente infectadas por VFA fue que una proporción de células BHK-21 o IBRS-2, estimada en 10^{-3} a 10^{-4} , sobrevivía a una infección lítica por el VFA. Estas células se pasaron seriadamente y mantuvieron la capacidad de producir VFA infeccioso, medible en los sobrenadantes de los cultivos (de la Torre y cols. 1985). La supervivencia celular podría ser resultado de variantes celulares resistentes al VFA, presentes en las poblaciones de BHK-21 ó IBRS-2. Para reducir la heterogeneidad, las células BHK-21 fueron clonadas para producir la línea celular BHK-21c1. Al infectar estas células BHK-21c1 con C-S8 o el purificado de placa C-S8c1 el índice de supervivencia celular fue de nuevo aproximadamente 10^{-3} (de la Torre y cols. 1985). La

línea celular C₁-BHK-Rc1 (abreviada como células R), derivada de la infección de una monocapa de BHK-21c1 con VFA C-S8c1 fue subcultivada 100 veces (14 meses en cultivo). El virus rescatado de estas células se denominó VR100 (de la Torre y cols. 1988; Díez y cols. 1990). Esta línea celular se caracteriza por la presencia de RNA viral, la presencia de antígenos virales, la producción de virus infeccioso y la resistencia a superinfección por VFA. Esta resistencia de las células R a superinfección por VFA es específica, ya que las células se infectan por otros virus RNA (de la Torre y cols. 1985). El estudio de las células R de distintos pases se pudo llevar a cabo mediante eliminación del virus por tratamiento con el agente antiviral ribavirina (Rb) (1-β-D ribofuranosil- 1, 2, 4 -triazol-3-carboxamida), manteniendo la viabilidad celular (de la Torre y cols. 1987). Resultados muy posteriores indicaron que la acción mutagénica de la ribavirina, observada primero con poliovirus (Crotty y cols. 2000), contribuye al efecto antiviral en infecciones persistentes de VFA en células en cultivo (Airaksinen y cols. 2003). Las células curadas por ribavirina, en las cuales no se detecta virus mediante RT-PCR (Martín-Hernández y cols. 1994), son parcialmente resistentes a la infección por varios aislados del VFA de serotipos A, C y O, pero producen rendimientos normales de otros virus RNA, como el VSV, el virus de la encefalomiocarditis y el virus Semliki Forest (de la Torre y cols. 1985, 1988; Martín-Hernández y cols. 1994). Se observó que a pesar de no tener virus detectable, las células curadas en pases tardíos de persistencia diferían considerablemente de las células parentales BHK-21, mostrando una morfología más redondeada, mayor grado de transformación, y considerable resistencia a C-S8c1 (de la Torre y cols. 1988, 1989b). Experimentos de fusión celular mostraron que la resistencia estaba mediada por productos celulares que actúan en *trans* (de la Torre y cols. 1989a).

Un estudio detallado de las primeras etapas del establecimiento de la persistencia demostró que el factor determinante de la iniciación de la persistencia fue, sorprendentemente, la rápida variación genotípica y fenotípica de las células, las cuales adquirieron muy rápidamente resistencia parcial al VFA (Martín-Hernández y cols. 1994). El grado de resistencia al VFA de las células persistentemente infectadas se incrementa con el número de pases de las células portadoras de virus (de la Torre y cols. 1988, 1989b). Las células R evolucionan manteniendo una extensa heterogeneidad con respecto a la susceptibilidad a VFA (de la Torre y cols. 1989b).

El virus rescatado de células R en su pase 100 (VR100) muestra varios cambios genéticos y fenotípicos respecto al virus parental C-S8c1 con el que se inició la persistencia. Entre los cambios fenotípicos se encuentran el carácter termosensible,

tamaño de placa pequeña e hipervirulencia para células BHK-21 (Díez y cols. 1990). El término hipervirulencia significa en este caso que el virus muestra un ciclo de infección más corto y permite la supervivencia de un menor número de células BHK-21 (de la Torre y cols. 1988, 1989b; Martín-Hernández y cols. 1994). Entre los cambios genéticos, se encuentran 2 cambios de aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína VP3 (D 9 A y N 13 H), comunes a los virus R99 y R146 (liberados en los países 99 y 146, respectivamente), y que no aparecen en la correspondiente posición de ningún otro picornavirus (Díez y cols. 1990; Toja y cols. 1999). El VR100 presenta además, otros dos cambios en el extremo N-terminal de la proteína VP3, C 7 V y M 14 L. La mutación D9A aparece también en variantes virales derivadas de la infección de células BHK-21 persistentemente infectadas curadas con Rb con el VFA C₃Arg/85 (Escarmís y cols. 1998). Al propagar en infecciones citolíticas seriadas en células BHK-21 el virus VR100, el tamaño de placa pequeño revirtió a tamaño normal en todos los casos analizados, pero la virulencia del VR100 no revirtió, incluso aumentó tras las infecciones citolíticas. La mayoría de las mutaciones fijadas en el VR100 se mantuvieron, pero la longitud del poliC disminuyó dramáticamente (Sevilla y Domingo 1996). La introducción de las mutaciones C 7 V y M 14 L en la cápsida de C-S8c1 no tiene efecto sobre el tamaño de placa y la producción viral durante infecciones líticas, ni en la estabilidad del virión, pero sí conduce a una pérdida de “fitness”. En cambio, la mutación D 9 A provoca una drástica reducción del tamaño de placa y la viabilidad. La competición del mutante C 7 V con virus “wild-type” implica la fijación de la mutación D 9 A en la cápsida C 7 V, y, por otra parte, la presencia de la mutación D 9 A conduce a la fijación de la mutación M14L. En ambos casos, las dos mutaciones, desventajosas individualmente, conducen juntas a un incremento de “fitness” del doble mutante. Estos resultados aportan evidencias de la existencia de una cadena de acontecimientos compensatorios ligados en una región definida de la cápsida del VFA durante infecciones citolíticas, así como la existencia de un “cluster” de sustituciones de aminoácidos en virus procedentes de infecciones persistentes que también pueden aparecer en infecciones citolíticas en respuesta a cambios causados por mutaciones previas (Mateo y Mateu 2006).

Durante la persistencia, las células hospedadoras se hacen progresivamente más resistentes al VFA y éste, a su vez, más virulento para las células, lo que representa un ejemplo de coevolución del virus infectante y de su célula hospedadora (de la Torre y cols. 1988). Coevolución es un concepto general relevante a la interacción entre

patógenos y sus hospedadores (revisión en Woolhouse y cols. 2002). Se ha descrito coevolución virus-célula para virus coxsackie A9 en células HeLa (Takemoto y Habel 1959), el virus linfotrópico del ratón en células L (Ron y Tal 1985), reovirus en células L (Ahmed y cols. 1981), poliovirus en células neuronales (Colbère-Garapin y cols. 1989), y virus de la hepatitis de ratón en células DBT (Chen y Baric 1996). Una población de células persistentemente infectadas con un virus y que evoluciona hacia una mayor resistencia a la infección por el mismo virus tiene que desarrollar algún mecanismo que potencie esta resistencia (inducción de inhibidores de la replicación viral, disminución de la expresión de receptores necesarios para el virus, etc). A su vez los virus deben desarrollar mecanismos para superar la barrera impuesta por la célula, incluyendo el reconocimiento de receptores alternativos.

2.6.2.- La virulencia en virus persistentes

Durante la persistencia, el VFA adquiere una mayor virulencia que el virus parental C-S8c1 para las células BHK-21 iniciales y la virulencia constituye un factor favorable para la persistencia (Sáiz y Domingo 1996). En un ensayo de muerte celular similar al descrito en Materiales y Métodos (sección 4.4.) el VR100 resultó 10^3 veces más virulento que C-S8c1 para BHK-21 (Sevilla y Domingo 1996).

La secuencia de nucleótidos del virus VR100 mostró aproximadamente un 1% de variación con respecto a C-S8c1 (Díez y cols. 1990; Escarmís y cols. 1992), y un poliC unos 145 residuos más largo que el poliC de C-S8c1, con algunos residuos de uridina intercalados a intervalos relativamente constantes en el poliC (Escarmís y cols. 1992). Existen trabajos previos que asocian mutaciones presentes en el VR100, tanto en la región del IRES como de la cápsida, con un incremento de virulencia (Martínez-Salas y cols. 1993; Baranowski y cols. 1998).

Una pregunta que se ha formulado en evolución general es que si, en caso de repetirse un proceso evolutivo en nuestra biosfera, se daría un resultado parecido o distinto a lo que conocemos actualmente. Evidentemente esta pregunta no puede tener una respuesta puesto que la evolución biológica que hemos conocido parcialmente en la Tierra no puede ser ensayada de nuevo. No obstante, algunos aspectos concretos de esta pregunta pueden ser abordados, aunque sea planteando un episodio evolutivo con entidades complejas y muy evolucionadas. Ello puede facilitarse con un virus RNA, dada su rápida capacidad de evolución. Como parte de esta Tesis Doctoral, se han

establecido dos nuevas líneas celulares de BHK-21 persistentemente infectadas con C-S8c1, con el objetivo de estudiar, mediante técnicas actuales no disponibles hace dos décadas, si las características básicas de la persistencia del VFA en células BHK-21 se repetían o diferían respecto a las observadas hace dos décadas (de la Torre y cols. 1985, 1988).

2.7.- Virulencia viral

La virulencia de un patógeno *in vivo* suele referirse a la capacidad para causar enfermedad o muerte del hospedador (Poulin y Combes 1999; Lenski y May 1994). En general, un virus virulento provoca una enfermedad significativa en el hospedador, mientras que un virus no virulento o atenuado, no causa enfermedad o causa una enfermedad leve. La alteración de la virulencia, mediante métodos directos o indirectos, permite la obtención de virus atenuados, que tienen una aplicación en el diseño de vacunas. La tecnología del DNA recombinante permite obtener virus quiméricos e introducir mutaciones definidas en los genomas virales con el objetivo de identificar genes relacionados con virulencia. En general, estos estudios han revelado que distintas zonas de los genomas virales pueden contribuir a su virulencia (revisiones en Racaniello 2006; Goodenow y cols. 2003; Rpicetta y cols. 2002).

Los genes virales que afectan a la virulencia se han clasificado en cuatro grupos (Flint y cols. 2004): 1) genes que afectan la capacidad replicativa del virus; 2) genes que modifican los mecanismos de defensa del hospedador; 3) genes que facilitan la propagación del virus en el mismo hospedador y entre hospedadores; 4) genes implicados en toxicidad para el hospedador.

2.7.1.- Relación entre capacidad replicativa (“fitness”) y virulencia

La relación entre capacidad replicativa (“fitness”) y virulencia ha sido abordada con diferentes organismos, obteniendo a menudo conclusiones controvertidas. Los virus RNA constituyen un sistema interesante para abordar esta cuestión, a causa de su rápida variación genética y fenotípica, y a la posibilidad de cuantificar “fitness” y virulencia en un mismo ambiente biológico.

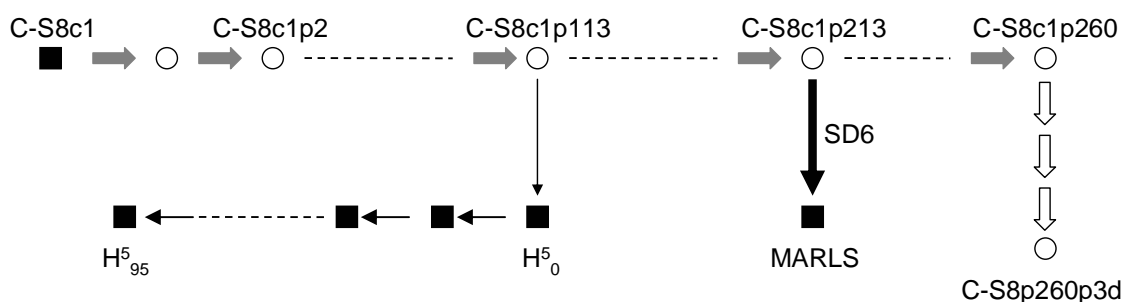


Figura 2.5. Esquema de la historia evolutiva de pases de los virus empleados en el estudio de la relación entre “fitness” y virulencia. Los clones biológicos están representados como cuadrados negros y las poblaciones virales como círculos vacíos. Las flechas grises anchas indican pases a alta m.d.i. (1-5 UFP/célula), las flechas finas negras indican pases placa a placa, la flecha ancha negra indica la selección de un mutante resistente al anticuerpo monoclonal SD6, y las flechas anchas vacías indican pases a baja m.d.i. a partir de la población C-S8p260, caracterizada por la presencia de genomas defectivos (García-Arriaza y cols. 2004). Los virus y el anticuerpo monoclonal SD6 se describen en Materiales y Métodos (sección 4.2.1.).

En esta Tesis Doctoral abordamos la relación entre “fitness” y virulencia del VFA en células BHK-21, empleando un conjunto de clones biológicos y poblaciones de VFA que derivan del clon C-S8c1 y que tienen una historia evolutiva bien definida (Figura 2.5.). En línea con los conceptos descritos en la sección 2.1.3., definimos “fitness” como capacidad replicativa del virus en las células BHK-21 en (Holland y cols. 1991; Martínez y cols. 1991; Domingo y Holland 1997; Domingo y cols. 2003; Quiñones-Mateu y Arts 2006). Definimos virulencia como el mínimo número de UFPs necesario para lisar un número definido de células BHK-21 en un tiempo determinado (García-Arriaza y cols. 2004; Sevilla y Domingo 1996). Tanto los valores de “fitness” como los de virulencia son siempre relativos a un virus referencia, en este caso el clon biológico C-S8c1. Los virus empleados se describen detalladamente en Materiales y Métodos (sección 3.2.1.) y sus relaciones evolutivas se representan en la Figura 2.5.

2.7.2.- Determinantes de virulencia

Estudios previos con poblaciones naturales y de laboratorio de VFA han definido, al menos, tres determinantes de virulencia en células de cultivo o en animales:

1. La cápsida viral, en la cual cambios de aminoácido que incrementan la carga positiva en la superficie median la unión a heparán sulfato, el uso de vías de entrada

- celular alternativas, y expansión del tropismo celular (Baranowski y cols. 1998; Jackson y cols. 1996; Ruiz-Jarabo y cols. 2004; Baranowski y cols. 2001, 2003).
2. La proteína no estructural 3A, en la cual delecciones o cambios de aminoácido pueden afectar a la virulencia de VFA en el ganado porcino y bovino (Beard y Mason 2000; Giraudo y cols. 1990), o contribuir a la expansión del rango de hospedador de VFA *in vivo* (Núñez y cols. 2001).
 3. El sitio de entrada interno del ribosoma (IRES), en el cual una sola mutación puede aumentar la traducción dependiente del IRES y la replicación del virus en células BHK-21 (Martínez-Salas y cols. 1993).

Estudios con rinovirus asociaron cambios de aminoácido en las proteínas no estructurales 2B, 2C y 3A con un incremento de virulencia en células de ratón (Harris y Racaniello 2003, 2005). Recientemente, se han identificado mutaciones en la proteína viral 24 (VP24) y la nucleoproteína del virus Ébola como principales determinantes moleculares de virulencia en ratones, aunque mutaciones en otras regiones del genoma también contribuyen a un incremento de virulencia, indicando que los determinantes de virulencia son multigénicos (Ebihara y cols. 2006). También se han descrito como determinantes de virulencia las tres glicoproteínas de la cápsida del virus de la fiebre porcina clásica (CSFV) (Meyers y cols. 1999; Rissatti y cols. 2005, 2006; van Gennip y cols. 2004), facilitando el desarrollo de posibles vacunas atenuadas para esta enfermedad (Mayer y cols. 2004; Moormann y cols. 1996; Risatti y cols. 2005).

En esta Tesis Doctoral se comparan valores de “fitness” y virulencia en BHK-21 para distintos clones y poblaciones de VFA y se mapean determinantes de virulencia del VFA.

Objetivos

3.- Objetivos

Los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido:

1. Estudiar la persistencia del VFA en cultivos celulares. Caracterizar, mediante las técnicas de las que se dispone en la actualidad, la dinámica del RNA viral intracelular y extracelular durante la persistencia reiniciada de nuevo con el clon de VFA C-S8c1 y células BHK-21, tal como se hizo hace dos décadas. Estudiar hasta qué punto se reproducen pautas de evolución definidas anteriormente para este sistema, principalmente la coevolución del virus y las células, a nivel genético y fenotípico.
2. Estudiar la relación entre capacidad replicativa o “fitness” y virulencia del VFA. Realizar un mapeo genético de determinantes de virulencia del VFA para células BHK-21.

Materiales y Métodos

4.- Materiales y métodos

4.1.- Cultivo de células eucarióticas

Se han empleado las siguientes líneas celulares establecidas:

- Células BHK-21, fibroblastos de riñón de hamster (Stocker y MacPherson 1964) que fueron clonadas por dilución límite (de la Torre y cols. 1988).
- Células BHK-R o células R, derivadas de una sublínea de células BHK-21 persistentemente infectadas con el VFA C-S8c1. Las células BHK-R establecidas en esta Tesis Doctoral corresponden a dos líneas celulares independientes denominadas células RB y RD.
- Células R-Rb, células R curadas del VFA mediante tratamiento con ribavirina (1- β -D ribofuranosil-1, 2, 4,-triazol-3-carboxamida) (Rb) (de la Torre y cols. 1987). Las células R-Rb utilizadas en esta Tesis Doctoral proceden de células R de los pases 90 y 100 tratadas con el agente antiviral ribavirina. El VFA no fue detectado en las células R-Rb ni por ensayos de infectividad ni por RT-PCR cuantitativa a tiempo real empleando oligonucleótidos específicos del VFA.

Estas líneas celulares se cultivaron hasta confluencia en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Dulbecco 1959), suplementado con aminoácidos no esenciales (Sigma), 50 μ g/ml de gentamicina (Sigma), 0.00002% de parahidroxibenzoato de butilo (Sigma), y 5% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco), en una atmósfera con 7% de CO₂, 98% de humedad y a 37° C tal como se ha descrito previamente (Domingo y cols. 1980).

4.2.- Virus

4.2.1.- Variantes del VFA

Se han empleado los siguientes VFA de serotipo C:

- C-S8c1: es un clon biológico procedente del aislado natural C₁ Santa Pau Sp/70 (Santa Pau, Girona, 1970) y obtenido mediante tres aislamientos sucesivos de placa en células BHK-21 (Sobrino y cols. 1983).
- Virus R (extra e intracelular): virus presente en el interior (virus R intracelular) o en el medio de cultivo (virus R extracelular) de células BHK-21 persistentemente infectadas con C-S8c1 a lo largo de los diferentes pases de la infección persistente.
- C-S8c1p213MARLS (denominado a lo largo de esta Tesis Doctoral virus MARLS): es un clon mutante de escape del anticuerpo monoclonal (ACM) SD6 [ACM neutralizante frente al bucle G-H de la proteína VP1 del VFA de serotipo C (Mateu y cols. 1990)] seleccionado a partir de la población C-S8c1p213 (clon C-S8c1 pasado 213 veces en células BHK-21) (Charpentier y cols. 1996). Presenta el cambio de aminoácido Leu144→Ser en el sitio antigénico A del bucle G-H de la proteína VP1 (Baranowski y cols. 1998). La eficacia biológica relativa de este clon es de 25 veces la del clon C-S8c1 (García-Arriaza y cols. 2005).
- C-S8c1p260p3d (denominado a lo largo de esta Tesis Doctoral virus C-S8p260p3d): es el virus C-S8c1p260 (clon C-S8c1 pasado 260 veces en células BHK-21) tras 3 pases seriados a baja multiplicidad de infección (m.d.i.) (diluyendo 10³ veces el virus antes de cada pase). La eficacia biológica relativa de este clon se ha calculado como de 20 veces la del clon C-S8c1 (García-Arriaza y cols. 2004).
- C-S8c1p113: es la población viral obtenida tras 113 pases seriados a alta m.d.i. de C-S8c1 en células BHK-21.
- H⁵₀: la serie de virus H deriva de la población C-S8c1p113. Se obtuvo virus de diez placas de esta población (H¹- H¹⁰), y cada uno de los clones virales fue sometido a sucesivos pases placa a placa (Escarmís y cols. 1996). H⁵₀ es el virus inicial, previo a los pases placa a placa.
- H⁵₉₅: es un virus obtenido tras 2 pases de una mezcla de 5 clones H⁵₉₅ (1-5) en células BHK-21. La mezcla empleada en el primer pase de infección contenía 1×10⁴

unidades formadoras de placa (UFPs) de cada clon. H^{5}_{95} tiene una eficacia biológica aproximadamente 9 veces menor que la de C-S8c1 (Pariente y cols. 2003). Los clones de la serie H^{5}_{95} son de muy baja eficacia biológica y fueron obtenidos tras 95 pases placa a placa del virus H^{5}_{0} . Los valores de eficacia biológica relativa se calcularon tomando como base el número de UFPs obtenidas en su progenie, tal como se justificó previamente en nuestro laboratorio comparando medidas de eficacia biológica mediante ensayos de competición y mediante la cantidad de partículas infecciosas encontradas por placa viral (Escarmís y cols. 1999).

- VR100: es un aislado del sobrenadante de un cultivo de células persistentemente infectadas con VFA C-S8c1 después de 100 pases en cultivos celulares (de la Torre y cols. 1985; Díez y cols. 1990).

4.2.2.- Virus quiméricos

Se han empleado virus generados a partir de clones infecciosos quiméricos que poseen distintas regiones del H^{5}_{95} y el resto del genoma de C-S8c1 (descripción más detallada en la sección 4.11.2. y Figura 4.1).

También se han construido virus mutantes que difieren en la secuencia de la proteína no estructural 2C respecto a C-S8c1 por la introducción de mutaciones puntuales que están presentes en la secuencia de los virus H^{5}_{95} , MARLS y C-S8c1p260p3d (sección 4.11.1. y Figura 4.1).

La numeración de los residuos del genoma del VFA se hará, a lo largo de esta Tesis Doctoral, según la descrita en Toja y cols. (1999).

Los virus quiméricos y mutantes empleados han sido los siguientes:

- pMT28/ H^{5}_{95} (436-2046): es un virus quimérico que posee la región comprendida entre los nucleótidos 436 y 2046 del H^{5}_{95} y el resto del genoma de C-S8c1.
- pMT28/ H^{5}_{95} (2046-3760): es un virus quimérico que posee la región comprendida entre los nucleótidos 2046 y 3760 del H^{5}_{95} y el resto del genoma de C-S8c1.

- pMT28/H⁵₉₅ (436-3760): es un virus quimérico que posee la región comprendida entre los nucleótidos 436 y 3760 del H⁵₉₅ y el resto del genoma de C-S8c1.
- pMT28/H⁵₉₅ (3760-5839): es un virus quimérico que posee la región comprendida entre los nucleótidos 3760 y 5839 del H⁵₉₅ y el resto del genoma de C-S8c1.
- pMT28/H⁵₉₅ (5839-7427): es un virus quimérico que posee la región comprendida entre los nucleótidos 5839 y 7427 del H⁵₉₅ y el resto del genoma de C-S8c1.
- pMT28/H⁵₉₅ (3760-7427): es un virus quimérico que posee la región comprendida entre los nucleótidos 3760 y 7427 del H⁵₉₅ y el resto del genoma de C-S8c1.
- pMT28/H⁵₉₅ (2046-7427): es un virus quimérico que posee la región comprendida entre los nucleótidos 2046 y 7427 del H⁵₉₅ y el resto del genoma de C-S8c1.
- pMT28/H⁵₉₅ (436-7427): es un virus quimérico que posee la región comprendida entre los nucleótidos 436 y 7427 del H⁵₉₅ y el resto del genoma de C-S8c1.
- H⁵₉₅/2C-3A(pMT28): es un virus quimérico que posee las regiones comprendidas entre los nucleótidos 436 y 4201, y 5839 y 7427 del H⁵₉₅, y el resto del genoma de C-S8c1, es decir, que su secuencia es idéntica a la del virus quimérico pMT28/H⁵₉₅ (436-7427) excepto la región comprendida entre los nucleótidos 4201 y 5839 (que incluye la región codificante de las proteínas 2C y 3A) que corresponde a C-S8c1.
- pMT28(SN): es un virus mutante en el que se ha introducido la mutación correspondiente a Ser80→Asn en la región codificante para la proteína 2C del C-S8c1.
- pMT28(TA): es un virus mutante en el que se ha introducido la mutación correspondiente a Thr256→Ala en la región codificante para la proteína 2C del C-S8c1.
- pMT28(QH): es un virus mutante en el que se ha introducido la mutación correspondiente a Gln263→His en la región codificante para la proteína 2C del C-S8c1.
- pMT28(SN, TA, QH): es un virus mutante en el que se han introducido las mutaciones correspondientes a Ser80→Asn, Thr256→Ala y Gln263→His en la región codificante para la proteína 2C del C-S8c1.

Los distintos virus quiméricos y mutantes se representan esquemáticamente en la Figura 4.1.

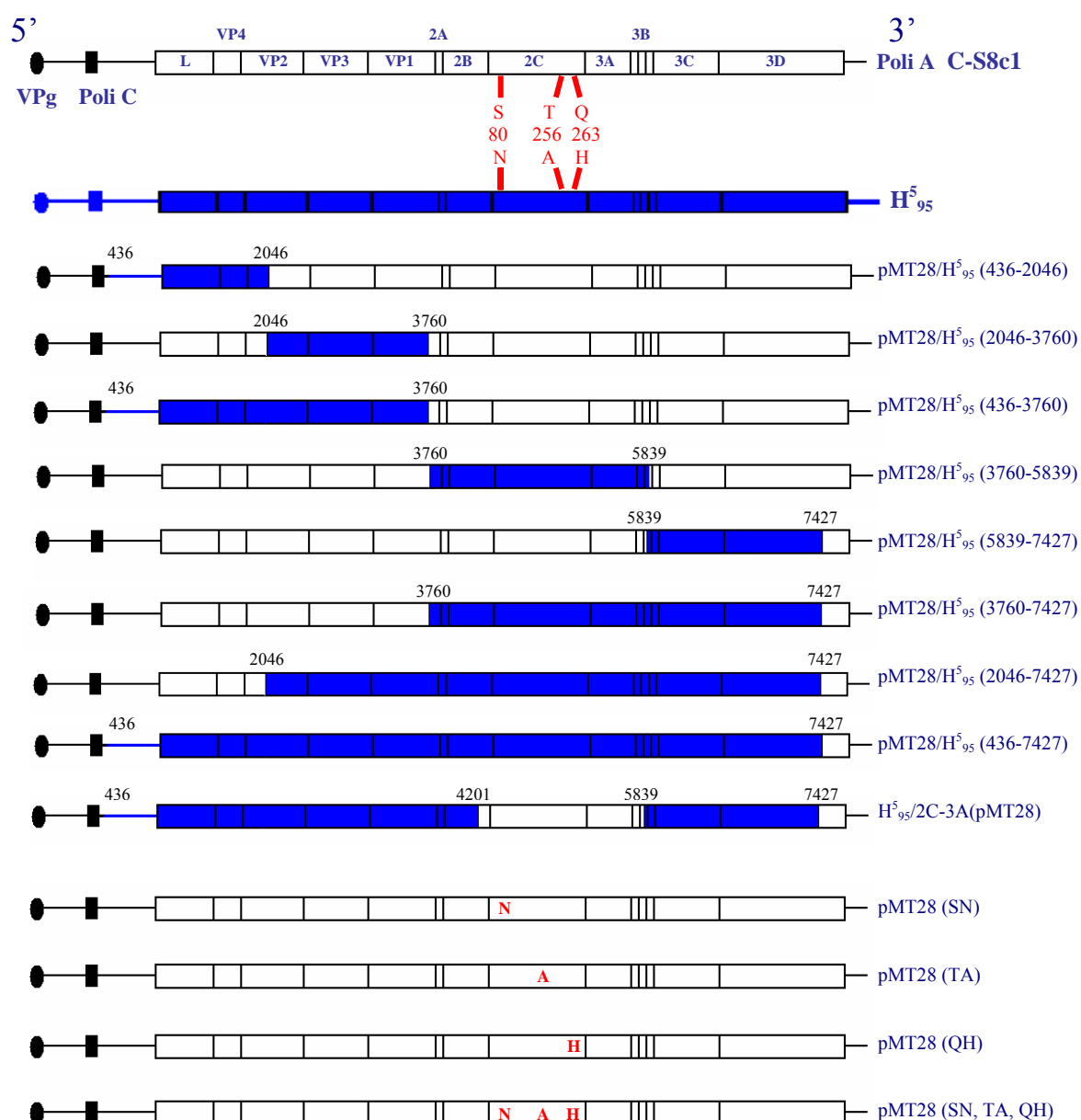


Figura 4.1. **Representación esquemática de los virus quiméricos y mutantes empleados en esta Tesis Doctoral.** Las zonas 5' y 3' no codificantes se indican con rayas horizontales y las zonas codificantes mediante rectángulos con el nombre de las proteínas codificadas. La proteína VPg y el tramo de poli C se representan como un círculo y un rectángulo, respectivamente, en la zona 5' no codificante. La zona en blanco corresponde a la región de C-S8c1 y la zona en azul a la de H⁵₉₅. Los números en la parte superior de cada genoma indican el primer y último nucleótido de la región de H⁵₉₅. Las posiciones en las que se han introducido cambios de aminoácido en la proteína 2C de C-S8c1 se indican en rojo. La numeración de los residuos del VFA es la descrita en Toja y cols. (1999). A la derecha de cada figura se indica el nombre del virus.

4.3.- Infecciones

4.3.1.- Infecciones en medio líquido

Los métodos de infección de células BHK-21 en medio líquido y los controles para asegurar ausencia de contaminaciones han sido descritos previamente (Domingo y cols. 1980; Sobrino y cols. 1983; Baranowski y cols. 1998).

4.3.2.- Plaqueo de virus en medio de agar semisólido en células BHK-21

Los métodos de plaqueo de virus en medio de agar semisólido en células BHK-21 han sido descritos previamente (Domingo y cols. 1980; Sobrino y cols. 1983; Baranowski y cols. 1998). Se infectaron 2×10^6 - 4×10^6 células con diluciones crecientes de virus. Tras una hora de adsorción a 37° C en una atmósfera con 7% de CO₂, 98% de humedad, se lavó la monocapa dos veces con DMEM y se añadió agar semisólido a una concentración final del 0.5% en medio DMEM con 2% de SBF y 1% de dietilaminoetil (DEAE) - dextrano. A continuación se incubó en las mismas condiciones de adsorción durante 16 a 30 horas, dependiendo del variante viral. Después de la incubación se fijaron las células con formaldehído al 2% y se tiñeron las monocapas fijadas con cristal violeta (2% cristal violeta en formaldehído al 2%).

4.4.- Ensayo de virulencia

El ensayo de virulencia se realizó tal como se describe en Sevilla y Domingo (1996), con ligeras modificaciones. La virulencia del VFA para células BHK-21 se define como el mínimo número de UFPs requerido para lisar un número definido de células en un tiempo determinado (Sevilla y Domingo 1996). En los ensayos realizados en esta Tesis Doctoral se define la virulencia como el mínimo número de UFPs necesarias para lisar 10^4 células BHK-21 en un tiempo determinado. En todos los casos se determinó la virulencia a distintos tiempos postinfección. Para ello se infectaron células BHK-21 en pocillos de placas M96 (10^4 células/pocillo) con diluciones seriadas de los virus (50 µl/pocillo), se fijaron las placas a distintos tiempos postinfección con formaldehído al 2% y se tiñeron con cristal violeta (2% cristal violeta en formaldehído al 2%) (García-Arriaza y cols. 2004).

4.5.- Purificación de virus

Las partículas virales de C-S8c1 fueron purificadas tal como se describe en Díez y cols. (1990). Los viriones provenientes de una infección se purificaron parcialmente por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa al 20% en TNE (Mateu y cols. 1987). Posteriormente, los virus parcialmente purificados se sometieron a un paso más de purificación mediante sedimentación en gradiente de sacarosa del 7,5% al 30% en TNE (Domingo y cols. 1980). Se recogieron fracciones de 700 μ l. El título viral de cada fracción se determinó mediante un ensayo de plaqueo (sección 4.3.2.).

4.6.- Extracción de virus R intracelular de células R

Se lavaron las monocapas de células R con tampón fosfato pH 6.0 y medio de cultivo con el fin de eliminar virus no adsorbido. A continuación fueron lisadas por 3 ciclos de congelación y descongelación, se centrifugó el medio de cultivo a 3000 r.p.m. para eliminar restos celulares y se recogió el sobrenadante.

4.7.- Extracción de RNA vírico

4.7.1.- Extracción de RNA vírico extracelular

El RNA vírico fue extraído a partir de 150 μ l del sobrenadante de infección de monocapas celulares utilizando Trizol (Gibco). En el caso de células R, se extrajo a partir de 300 ó 500 μ l del medio de cultivo celular para realizar la cuantificación de moléculas de RNA (positivas y negativas) y para secuenciación, respectivamente. El sobrenadante se mezcló con el doble de volumen de Trizol y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente; se añadió cloroformo (100 μ l por cada 150 μ l de sobrenadante), se agitó y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Tras centrifugación de 15 minutos a 12.000 r.p.m. (14.819 g), se separaron las dos fases y los ácidos nucleicos se recuperaron de la fase acuosa por precipitación con isopropanol.

4.7.2.- Extracción de RNA vírico intracelular

Para la extracción del RNA vírico intracelular, las monocapas se lavaron previamente con tampón fosfato pH 6.0 y medio de cultivo con el fin de eliminar virus no adsorbido. Las células se despegaron de la placa con tripsina y se congelaron en suero bovino fetal suplementado con 10 % DMSO. Las células congeladas se centrifugaron a 3000 r.p.m. y se resuspendieron en 500 µl de medio DMEM con 2% de suero bovino fetal y se extrajo el RNA vírico por el mismo método descrito anteriormente para el RNA vírico extracelular (sección 4.7.1.).

4.8.- Obtención de cDNA y amplificación por RT-PCR de RNA vírico

Para la reacción de transcripción inversa del RNA vírico (obtención del cDNA del RNA del VFA) se empleó la retrotranscriptasa del virus de la mieloblastosis aviar AMV-RT (Promega). Las reacciones de amplificación por PCR del cDNA se llevaron a cabo utilizando Ampli-Taq polimerasa (Perkin Elmer). En ambos casos se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante, realizando el proceso de amplificación por RT-PCR en un solo paso en el tampón y concentración óptimas para la Ampli-Taq.

En el caso de los virus R y el virus H⁵₉₅, debido a la cantidad limitante de RNA, las reacciones de RT-PCR se realizaron en dos pasos. Para la reacción de transcripción inversa del RNA vírico se empleó la RT Transcriptor (Roche); las reacciones de amplificación se realizaron con la DNA polimerasa termoestable EHF (Expand High Fidelity) (Roche), que es una polimerasa de alta fidelidad de copia, ya que posee actividad correctora de errores (actividad exonucleasa 3'→5') (Barnes 1994), para minimizar los errores introducidos por la polimerasa en el proceso de amplificación. En ambos casos se siguieron las instrucciones facilitadas por el proveedor.

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio o SYBR-SAFE (Invitrogen Molecular Probes).

Dado que se determinaron secuencias consenso, posibles mutaciones introducidas durante la RT-PCR no pueden afectar a ninguno de los resultados presentados. Los oligonucleótidos empleados se detallan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Secuencia de los oligonucleótidos empleados.

Región ^a	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Orientación ^b	Posición ^c
Fragmento S	SR3	TTGAAAGGGGGCGCTAGGGTC	s	1
	SD4HpaI	TGAAAGGCGGGTTTCGGGTG	a	367
Pseudonudos	NR2	TAAGTTTACCCTGTCTCCCG	s	368
	NR4BamHI	TGTACAAACACGATCTAAGCAGGTTT	s	561
IRES	NR1New	AACTCTCCTTGGTAACAAGGACC	s	742
Proteasa L	LRIL	CGGAGGTCGGCACCTTTCCTTTA	s	1002
	LD1L	GCCTTCCACCCTTCATTGAGTGG	a	1619
VP1	4D1New	TTGTTCTGGGTGTTGGTTGTGTG	a	1835
VP2	EPF2	GAAGACCGCATTCTCACTACCCG	s	1927
	2R1New	CTGGTCTAGAGAGACGCGCTTCATC	s	2042
	2R2New	GATGGGCGACATCAGTGACAGGG	s	2280
	JH2	GGGTTGATGAAGTGGTGGG	a	2345
	2R3New	CACGGTGCCCAACAGATCAAAG	s	2470
VP3	JD5New	GCACGTACGCCACCATGTACCG	a	2926
	3R2New	CTTTGAGCTCCGGCTACCTGTG	s	3171
VP1	NK26	GACCTTCACAAACCGG	a	3333
	AV1New	GGATTGGTTGTGTTGTAAAGTGC	a	3518
	1R1L	ACACCGTGTGTTGGCTACGGCG	s	3572
2A-2B	pU	GAAGGGCCAGGGTTGGACT	a	3888
2B	2BR1	TTGGTGTCTGCTTTTGAGGAAC	s	3988
	2BD1	CAAACGTGCTGTCCAGAATCTC	a	4190
2C	2BR2	GAAGACCTTGAGAGAGCAGAG	s	4318
	2CD1	CTCTTCTGAGGCGATCCATGC	a	4458
	mutSNu	TTGAAGAA <u>AC</u> GGGAACGTCCATATTGC ^d	s	4576
	2CR1	AGAGCGGGAACGTCCATATTG	s	4580
	mutSnd	CGTTCCCGT <u>TT</u> CTTCAAACACACTTGG ^d	a	4591
	mutTAu	GAAGACACCCACG <u>CC</u> AATCCAGTGGC ^d	s	4098
	2CD3	CGCTCACGTCGATGTCAAAGTG	a	5047
	mutTAd	ACTGGATTGG <u>G</u> CGTGGGTGTCTTCAAGTGC ^d	a	5120
	mutQHu	GGCAATGTTTCA <u>CT</u> ACGACTGTGCCC ^d	s	5121
	mutQHd	GGCACAGTCGTA <u>GT</u> GAAACATTGCC ^d	a	5145
3A	3AD1	GAGTCGTGTACCATGCCCTC	a	5396
	5331wtnew	GTCATCATGATCCGCGA	s	5515
	5331C ⁹ ₂₂ new	TCATCATGATCCGCGCGA	s	5516
3C	3CD1	CATGACCATCTTTTGCAGGTCAG	a	6003
	A2Sac I	CAGAGCTCGACCCCTGAACCGCACACGA ^e	s	6581
3D	3DR1	GAAACGCCGCGGTGCACTTATC	s	6984
	B2New	CACTGCAGCGATGCCATGAACATC	s	7351
	U	GGATGCCATCTGGCTGT	s	7493
	A	AGGAGATCATGGTGTAGGTGTC	a	7615
	C-Not-Pol	CCAATTGTGATGTTTGG <u>CGGCCG</u> CTGCGTCGCCGCACACGGCGTTC ^e	a	8043

Región ^a	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Orientación ^b	Posición ^c
3' UTR	ED6EcoRI	GCCCCGAATTCATTGTGCCAATTGT ^e	a	8060
	R-end	TTTGGATTAAGGAAGCGGGAAAAGCCC	a	8115

^a Región genómica a la que corresponde el oligonucleótido (Introducción, sección 2.3.1.).

^b Orientación del oligonucleótido iniciador: s significa “sentido” (de la misma polaridad que el RNA genómico del VFA); a significa “antisentido” (de la polaridad de la cadena negativa del VFA).

^c Se indica la posición en el genoma del VFA (Toja y cols. 1999) del nucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido iniciador.

^d La mutación presente en los oligonucleótidos utilizados para realizar mutagénesis dirigida está subrayada.

^e La diana de restricción presente en los oligonucleótidos utilizados está subrayada y en cursiva.

4.9.- Purificación de fragmentos de PCR

Los productos de amplificación de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (NuSieve, Sea-Plaque) (FMC), en tampón TAE (sección 4.18.). El DNA de la banda deseada se purificó usando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA se cuantificó por tinción con bromuro de etidio o SYBR SAFE (Invitrogen Molecular Probes) en geles de agarosa y comparación de la intensidad de la banda con marcadores de concentración conocida.

Cuando no fue necesario purificar el DNA por electroforesis en gel de agarosa y para eliminar oligonucleótidos y dNTPs no incorporados, los fragmentos de DNA sintetizados se filtraron a través de membranas de Microcon (Millipore).

4.10.- Cuantificación del RNA vírico

4.10.1.- Cuantificación de moléculas de RNA totales

La cuantificación de RNA se realizó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real con el aparato “Light Cycler” (Roche). Este método mide la cantidad de producto de RNA amplificado en cada ciclo de la reacción de PCR mediante la unión de una sonda fluorescente (SYBR Green I) que se une específicamente al DNA de doble banda, de forma que la amplificación puede detectarse por la intensidad de fluorescencia

emitida (que es proporcional a la cantidad de producto presente en la muestra). La cuantificación de RNA de las muestras se determinó por extrapolación de los valores de fluorescencia obtenidos en una curva patrón realizada en paralelo con RNA de pMT28 (RNA transcrito a partir del plásmido pMT28), cuya concentración fue determinada por espectrofotometría mediante densidad óptica a 260 nm y por electroforesis en gel de agarosa. El plásmido pMT28 es un clon infeccioso de C-S8c1 derivado del pMT15 (Toja 1997), que contiene 35 residuos de citidina en el poliC, 25 adenosinas en el poliA y no contiene ninguna secuencia entre el inicio del genoma de C-S8c1 y el promotor de la SP6 polimerasa, y su secuencia corresponde a la del genoma de C-S8c1.

La especificidad de las reacciones de amplificación se comprobó con el análisis de la curva de fusión del DNA amplificado. Las curvas de fusión permiten distinguir entre productos de amplificación específica y productos artefactuales de bajo peso molecular (como dímeros de oligonucleótidos), ya que los específicos presentan una temperatura de fusión más alta. Los productos de las amplificaciones resultantes fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa para comprobar que el producto tenía la longitud esperada. Se determinó el número mínimo de moléculas de RNA que pueden ser cuantificadas en estas condiciones experimentales utilizando diluciones seriadas de RNA de pMT28 de concentración conocida. El límite de detección de esta RT-PCR fue de $1,8 \times 10^2$ moléculas de RNA por muestra.

Se utilizó el kit “Light Cycler RNA Master SYBR Green I” (Roche) y se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante, optimizando la concentración de Mn^{2+} a 3 mM. La enzima utilizada fue la Tth polimerasa, que es una enzima termoestable que posee actividad retrotranscriptasa y polimerasa (Myers y Gelfand 1991), que permite realizar RT y PCR en una sola reacción. La región amplificada para la cuantificación de RNA vírico fue 3D (altamente conservada entre los distintos serotipos del VFA), y los oligonucleótidos empleados fueron A y U (Tabla 4.1.).

4.10.2.- Cuantificación de moléculas de RNA de polaridad positiva y negativa

La cuantificación de moléculas de RNA positivas y negativas del VFA se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real con el aparato “Light Cycler” (Roche), tras un paso previo de transcripción inversa del RNA (RT).

La reacción de RT se llevó a cabo empleando el kit Transcriptor RT (Roche) y usando el oligonucleótido A o el tag-U para cuantificar cadenas positivas o negativas respectivamente (Tabla 4.2.). El oligonucleótido U fue marcado con un “tag” correspondiente a un oligonucleótido de LCMV que no hibrida con el genoma de VFA.

Tabla 4.2. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la cuantificación de moléculas de RNA vírico de polaridad positiva y negativa.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Orientación ^a	Posición ^b
U	GGATGCCATCTGGCTGT	s	7493
A	AGGAGATCATGGTGTAGGTGTC	a	7615
tag-U ^c	tag-GGATGCCATCTGGCTGT	s	7493
tag ^d	AGTTTAAGAACCCTTCCCGC	s	—

^a Orientación del oligonucleótido iniciador: s significa “sentido” (de la misma polaridad que el RNA genómico del VFA); a significa “antisentido” (de la polaridad de la cadena negativa del VFA).

^b Se indica la posición en el genoma del VFA (Toja y cols. 1999) del nucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido iniciador.

^c El oligonucleótido U fue marcado con un “tag” correspondiente a un oligonucleótido de LCMV que no hibrida con el genoma de VFA.

^d Oligonucleótido de LCMV empleado como “tag” que no hibrida con el VFA.

Para la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real se utilizó el kit “Light Cycler FastStart RNA Master SYBR Green I” (Roche) y se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante. La región amplificada para la cuantificación del RNA vírico fue 3D (altamente conservada entre los distintos serotipos del VFA). La cuantificación de RNA de las muestras se determinó por extrapolación de los valores de fluorescencia obtenidos en una curva patrón realizada en paralelo con RNA de polaridad positiva (RNA transcrito de cadena positiva a partir de pMT28) o negativa (RNA transcrito de cadena negativa de la región 3D) (Tabla 4.3.). La curva estándar de RNA de polaridad positiva corresponde a diluciones seriadas de RNA transcrito de cadena positiva de pMT28. Diseñamos una curva estándar de cadena negativa que corresponde a diluciones seriadas de RNA transcrito de cadena negativa de la región 3D del genoma de VFA.

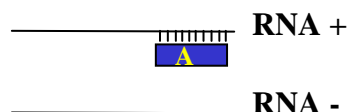
Tabla 4.3. Curvas estándar empleadas en la cuantificación de cadenas positivas y negativas.

Curva estándar de cadena positiva	Moléculas RNA + / μ l	Curva estándar de cadena negativa	Moléculas RNA - / μ l
pMT28 dilución 10^{-1}	$1,8 \times 10^8$	3D dilución 10^{-3}	$2,2 \times 10^8$
pMT28 dilución 10^{-2}	$1,8 \times 10^7$	3D dilución 10^{-4}	$2,2 \times 10^7$
pMT28 dilución 10^{-3}	$1,8 \times 10^6$	3D dilución 10^{-5}	$2,2 \times 10^6$
pMT28 dilución 10^{-4}	$1,8 \times 10^5$	3D dilución 10^{-6}	$2,2 \times 10^5$
pMT28 dilución 10^{-5}	$1,8 \times 10^4$	3D dilución 10^{-7}	$2,2 \times 10^4$
pMT28 dilución 10^{-6}	$1,8 \times 10^3$	3D dilución 10^{-8}	$2,2 \times 10^3$

La cuantificación de RNA de las muestras se determinó por extrapolación de los valores de fluorescencia obtenidos en una curva patrón realizada en paralelo con RNA transcrito de cadena positiva a partir de pMT28, en el caso de cuantificación de cadenas positivas, y RNA transcrito de cadena negativa de la región 3D, en el caso de cuantificación de cadenas negativas. El plásmido pMT28 es un clon infeccioso de C-S8c1 derivado del pMT15 (Toja 1997), que contiene el genoma completo de C-S8c1 bajo el control del promotor de la SP6 polimerasa. La concentración del RNA de las muestras se determinó por extrapolación del valor de fluorescencia de la curva estándar obtenida con el RNA transcrito de pMT28 o 3D, cuya concentración fue determinada mediante densidad óptica a 260 nm y por electroforesis en gel de agarosa.

Para cuantificar cadenas positivas (genómicas) se llevó a cabo la reacción de RT empleando el oligonucleótido A, complementario a la región comprendida entre el nucleótido 7594 y el nucleótido 7615, que copia cadenas positivas, y posteriormente la reacción de real-time PCR utilizando los oligonucleótidos A y U (idéntico a la región comprendida entre el nucleótido 7493 y el nucleótido 7509 de la cadena positiva). En el caso de la cuantificación de cadenas negativas, la reacción de RT se realizó empleando el oligonucleótido tag-U, compuesto por una secuencia (“tag”) que no se encuentra presente en el genoma de VFA en ninguna de las dos polaridades, y la secuencia del oligonucleótido U que copia cadenas negativas, y posteriormente la reacción de real-time PCR con los oligonucleótidos A y tag (Figura 4.2.). Se realizaron varios controles para asegurar la especificidad de las amplificaciones de RNA de cadena positiva y negativa que se describen en Resultados (secciones 5.5.1-4.).

* Cuantificación de moléculas RNA + :



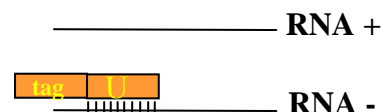
RT
Oligonucleótido A: copia cadena +



**PCR cuantitativa
a tiempo real**
Oligonucleótidos A + U

Curva patrón Light Cycler:
RNA pMT28 (cadena +)

* Cuantificación de moléculas RNA - :



RT
Oligonucleótido U-tag: copia cadena -



**PCR cuantitativa
a tiempo real**
Oligonucleótidos A + tag

Curva patrón Light Cycler:
RNA 3D (cadena -)

Figura 4.2. **Representación esquemática de la estrategia de cuantificación de moléculas de RNA positivas y negativas.** Para cuantificar cadenas positivas se llevó a cabo la reacción de RT a 55° C empleando el oligonucleótido A, que copia cadenas positivas, y posteriormente la reacción de real-time PCR a una temperatura de hibridación de 60° C utilizando los oligonucleótidos A y U. En el caso de la cuantificación de cadenas negativas, la reacción de RT se realizó a 55° C empleando el oligonucleótido U-tag (oligonucleótido U marcado con un “tag”), que copia cadenas negativas, y posteriormente la reacción PCR a tiempo real a una temperatura de hibridación de 60° C con los oligonucleótidos A y tag.

4.11.- Clonaje molecular

4.11.1.- Mutagénesis dirigida en un clon infeccioso de VFA

Las construcciones se hicieron tomando como genoma de partida el plásmido pMT28. Las mutaciones correspondientes a los 3 cambios de aminoácido en la proteína 2C fueron introducidas por mutagénesis dirigida en el pMT28 por PCR utilizando pMT28 como molde (Figura 4.3.). Para introducir la mutación Ser80→Asn se diseñaron los oligonucleótidos mutSNu y mutSNd, para la mutación Thr256→Ala se diseñaron mutTAu y mutTAd, y para la mutación Gln263→His se diseñaron mutQHu y mutQHd, que presentaban el cambio de nucleótido necesario (Tabla 4.1.). Las amplificaciones de la región que codifica para 2C, e incluye cada una de las mutaciones, se realizaron con la DNA polimerasa termoestable EHF (Expand High Fidelity) (Roche) empleando el oligonucleótido correspondiente de los mencionados anteriormente y otro oligonucleótido externo, 3CD1 ó 3R2New, tal como se muestra en la Tabla 4.4. En el caso de la mutación Ser80→Asn se empleó la pareja de oligonucleótidos mutSNu y 3R2New para obtener el fragmento A, y la pareja 3CD1 y mutSNd para obtener el fragmento B. En el caso de la mutación Thr256→Ala se empleó la pareja de oligonucleótidos mutTAu y 3R2New para obtener el fragmento A, y la pareja 3CD1 y mutTAd para obtener el fragmento B. En el caso de la mutación Gln263→His se empleó la pareja de oligonucleótidos mutQHu y 3R2New para obtener el fragmento A, y la pareja 3CD1 y mutQHd para obtener el fragmento B. Los fragmentos A y B obtenidos para cada una de las mutaciones fueron purificados mediante filtración a través de membranas de Microcon (Millipore) y recombinados en una reacción de PCR “shuffling” (Núñez y cols. 2001), utilizando cantidades equimoleculares de dichos fragmentos (A y B) y los oligonucleótidos 3CD1 y 3R2New.

Tabla 4.4. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para obtener los fragmentos A y B en la estrategia de mutagénesis dirigida empleada.

Cambio de aminoácido ^a	Fragmento A ^b	Fragmento B ^c	Orientación ^d
Ser80→Asn	mutSNU	3R2New	s
	3CD1	mutSND	a
Thr256→Ala	mutTAU	3R2New	s
	3CD1	mutTAD	a
Gln263→His	mutQHU	3R2New	s
	3CD1	mutQHD	a

^a Cambio de aminoácido introducido mediante mutagénesis dirigida en la región que codifica para la proteína 2C.

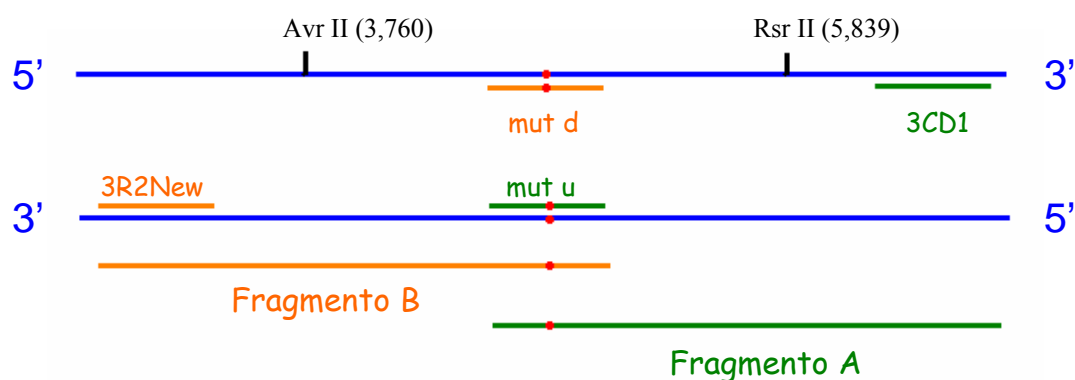
^b Oligonucleótidos empleados para obtener el fragmento A.

^c Oligonucleótidos empleados para obtener el fragmento B.

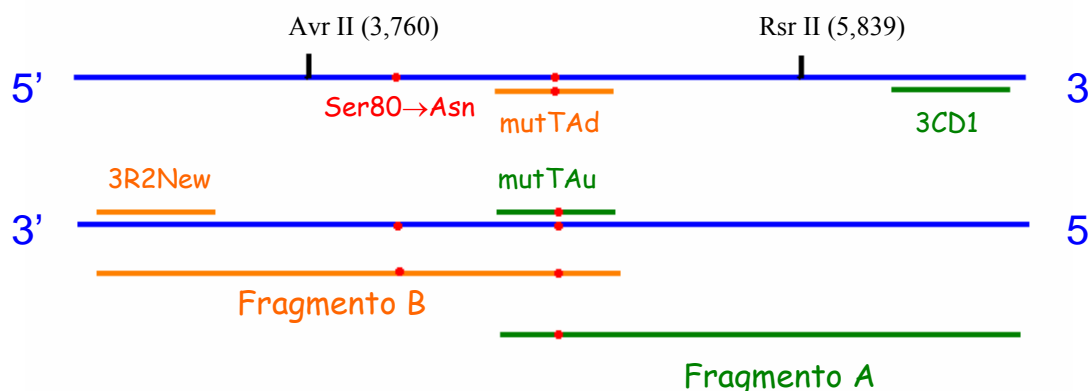
^d Orientación del oligonucleótido iniciador: s significa “sentido” (de la misma polaridad que el RNA genómico del VFA); a significa “antisentido” (de la polaridad de la cadena negativa del VFA). La secuencia de los oligonucleótidos se indica en la Tabla 4.1.

Los productos finales, que incluyen la secuencia de 2C con la mutación deseada (nucleótido 3171 al 6003), fueron digeridos con *Avr II* y *Rsr II* (que cortan en el nucleótido 3760 y 5839, respectivamente). El tratamiento del DNA con enzimas de restricción (New England Biolabs) se llevó a cabo siguiendo los consejos del proveedor.

A.



B.



C.

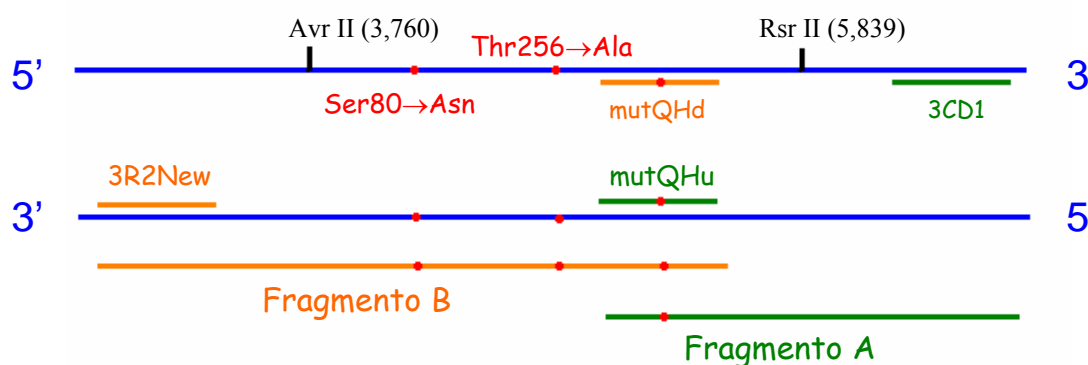


Figura 4.3. **Representación esquemática de la estrategia de mutagénesis dirigida.** Las líneas azules representan el clon infeccioso empleado como molde [pMT28, en el caso de la parte A; pMT28(SN), en el caso de la parte B; pMT28(SN, TA), en el caso de la parte C]; los oligonucleótidos empleados para obtener los fragmentos A y B están representados en verde y naranja, respectivamente; el cambio de nucleótido necesario para obtener la mutación está representado por un punto rojo. La parte A representa la estrategia empleada para obtener los mutantes simples [pMT28(SN), pMT28(TA) y pMT28(QH)]. Los oligonucleótidos mut d y mut u presentan el cambio de nucleótido necesario en cada caso (mutSNd y mutSNu para introducir la mutación Ser80→Asn; mutTAd y mutTAu para introducir la mutación Thr256→Ala; mutQHd y mutQHu para introducir la mutación Gln263→His). La parte B representa la estrategia empleada para obtener el doble mutante pMT28(SN, TA). La parte C representa la estrategia empleada para obtener el triple mutante pMT28(SN, TA, QH). Los fragmentos A y B obtenidos (con el cambio de nucleótido deseado) fueron recombinados en una reacción de PCR “shuffling” empleando los oligonucleótidos 3CD1 y 3R2New. El producto final, que incluye la secuencia de 2C con la mutación deseada (nucleótido 3171 al 6003), fue digerido con *Avr II* y *Rsr II* (que cortan en el nucleótido 3760 y 5839, respectivamente).

Los fragmentos de DNA obtenidos se purificaron como se describe en la sección 4.9. y se ligaron al plásmido pMT28, previamente digerido *Avr II* y *Rsr II*, empleando la T4 DNA ligasa (Roche). Para impedir la religación del vector, previamente se eliminó el grupo 5' fosfato de los extremos del vector por tratamiento con fosfatasa alcalina (USB). Los clones infecciosos obtenidos fueron denominados pMT28(SN) (portador de la mutación Ser80→Asn), pMT28(TA) (portador de la mutación Thr256→Ala) y pMT28(QH) (portador de la mutación Gln263→His).

Para obtener el triple mutante [pMT28(SN, TA, QH)] con las 3 mutaciones en la proteína 2C se llevó a cabo la misma estrategia de mutagénesis dirigida por PCR descrita anteriormente con algunas variaciones: primero, se creó un clon infeccioso doble mutante [pMT28(SN, TA)] empleando como molde, en lugar del clon infeccioso pMT28, el clon infeccioso pMT28(SN) con la mutación Ser80→Asn y los oligonucleótidos diseñados para obtener la mutación Thr256→Ala (mutTAu y mutTAd). De esta forma se obtuvo un clon infeccioso doble mutante portador de las mutaciones Ser80→Asn y Thr256→Ala. Por último, se utilizó este clon infeccioso pMT28(SN, TA) como molde y los oligonucleótidos diseñados para introducir la mutación Gln263→His (mutQHu y mutQHd), obteniendo como resultado el clon infeccioso triple mutante deseado [pMT28(SN, TA, QH)].

Los productos de ligación se clonaron en células competentes de *E. coli* DH5 α (Woodcock y cols. 1988) y las colonias de bacterias se aislaron en placas Petri con medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russell 2001) conteniendo ampicilina (100 μ g/ml, Sigma). Se tomaron bacterias de la placa Petri, se cultivaron durante toda la noche en medio LB más ampicilina (100 μ g/ml) y se extrajo de ellas el DNA plasmídico con el kit *Wizard SV Minipreps* (Promega).

4.11.2.- Clonaje molecular para obtener clones infecciosos quiméricos

Las construcciones se hicieron tomando como genoma de partida el plásmido pMT28. Se construyeron plásmidos quiméricos sustituyendo distintas regiones del pMT28 por la secuencia correspondiente de H⁵₉₅ (los virus quiméricos obtenidos se representan en la Figura 4.1.).

Las amplificaciones a partir del RNA de H⁵₉₅ se realizaron utilizando las siguientes parejas de oligonucleótidos (Tabla 4.1.): NR2 y JH2 [clon infeccioso quimérico **pMT28/H⁵₉₅ (436-2046)**]; 2R1New y pU [clon infeccioso quimérico **pMT28/H⁵₉₅ (2046-3760)**]; 3R2New y 3CD1 [clon infeccioso quimérico **pMT28/H⁵₉₅ (3760-5839)**]; y 5531wtnew y C-Not-Pol [clon infeccioso quimérico **pMT28/H⁵₉₅ (5839-7427)**]. La reacción de transcripción inversa del RNA vírico se realizó con la RT Transcriptor (Roche), y las reacciones de PCR se realizaron con la DNA polimerasa EHF (Expand High Fidelity) (Roche). Los productos de PCR y el plásmido pMT28 se digirieron con las siguientes enzimas de restricción: Hpa I y Xba I, que cortan en las posiciones 436 y 2046 respectivamente [clon infeccioso quimérico **pMT28/H⁵₉₅ (436-2046)**]; Xba I y Avr II, que cortan en las posiciones 2046 y 3760 respectivamente [clon infeccioso quimérico **pMT28/H⁵₉₅ (2046-3760)**]; Avr II y Rsr II, que cortan en las posiciones 3760 y 5839 respectivamente [clon infeccioso quimérico **pMT28/H⁵₉₅ (3760-5839)**]; y Rsr II y Bam HI, que cortan en las posiciones 5839 y 7427 respectivamente [clon infeccioso quimérico **pMT28/H⁵₉₅ (5839-7427)**]. Los productos de digestión se purificaron como se describe en la sección 4.9., y se ligaron al plásmido pMT28 empleando la T4 DNA ligasa (Roche).

El clon infeccioso quimérico **pMT28/H⁵₉₅ (436-3760)** se obtuvo empleando la misma estrategia que para obtener el plásmido pMT28/H⁵₉₅ (436-2046) pero tomando como plásmido de partida el pMT28/H⁵₉₅ (2046-3760) en lugar de pMT28. El clon infeccioso quimérico **pMT28/H⁵₉₅ (3760-7427)** se obtuvo empleando la misma estrategia que para obtener el plásmido pMT28/H⁵₉₅ (5839-7427) pero tomando como plásmido de partida el pMT28/H⁵₉₅ (3760-5838) en lugar de pMT28. El clon infeccioso quimérico **pMT28/H⁵₉₅ (436-7427)** se obtuvo en dos pasos: primero se creó el plásmido **pMT28/H⁵₉₅ (2046-7427)** empleando la misma estrategia que para obtener el plásmido pMT28/H⁵₉₅ (2046-3760) pero tomando como plásmido de partida el pMT28/H⁵₉₅ (3760-7427) en lugar de pMT28; luego se obtuvo el **pMT28/H⁵₉₅ (436-7427)** empleando la misma estrategia que para obtener el plásmido pMT28/H⁵₉₅ (436-2046) pero tomando como plásmido de partida el pMT28/H⁵₉₅ (2046-7427) en lugar de pMT28. Por último se introdujo la secuencia “wild-type” correspondiente a la región codificante de las proteínas 2C y 3A en el clon infeccioso quimérico pMT28/H⁵₉₅ (436-7427) [**H⁵₉₅/2C-3A(pMT28)**] digiriendo pMT28 (para obtener un inserto con la secuencia de 2C y 3A “wild-type”) y el plásmido pMT28/H⁵₉₅ (436-7427) con las

enzimas de restricción Bgl II y Rsr II, que cortan en los nucleótidos 4201 y 5839, respectivamente. Los productos de digestión se purificaron como se describe en la sección 4.9. y se ligaron al plásmido correspondiente en cada caso empleando la T4 DNA ligasa (Roche).

Los productos de ligación se clonaron en células competentes de *E. coli* DH5 α (Sambrook y Russell 2001) y el DNA plasmídico fue extraído y purificado con el kit *Wizard SV Minipreps* (Promega).

4.11.3.- Clonaje molecular para obtener un RNA correspondiente a la región 3D del VFA de polaridad negativa

Se amplificó la región codificante de la proteína 3D de C-S8c1 mediante PCR con la DNA polimerasa EHF (Expand High Fidelity) (Roche), empleando como molde el clon infeccioso pMT28 y los oligonucleótidos A2Sac I y ED6EcoRI (Tabla 4.1.). Se purificó el fragmento obtenido como se describe en la sección 4.9. y se llevó a cabo una reacción de “tailing” en un volumen final de 10 μ l empleando 5 μ l (25 ng) del DNA, 1 μ l del tampón de la enzima Ampli-Taq polimerasa (Perkin Elmer), 0,6 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2 μ l de dATP 1mM, 0,4 μ l de agua milli Q estéril y 5U de Ampli-Taq polimerasa (Perkin Elmer) en 1 μ l. La mezcla se incubó a 70° C durante 30 minutos. El producto de la reacción de “tailing” se ligó al vector pGEM-T Easy (Promega).

Los productos de ligación se clonaron en células competentes de *E. coli* DH5 α (Woodcock y cols. 1988) y las colonias de bacterias se aislaron en placas Petri con medio LB (Sambrook y Russell 2001) conteniendo ampicilina (100 μ g/ml, Sigma), IPTG (400 μ g/ml, Sigma) y X-gal (400 μ g/ml, Sigma). El vector pGEM-T Easy incluye una secuencia codificante para resistencia a ampicilina y otra del gen *lacZ* que permite la selección por color en presencia de X-gal e IPTG (Sambrook y Russell 2001). Se tomaron bacterias de las colonias seleccionadas de la placa Petri y se cultivaron durante toda la noche en medio LB más ampicilina (100 μ g/ml). A continuación, se extrajo de ellas el DNA plasmídico con el kit *Wizard SV Minipreps* (Promega).

Para obtener un transcrito de polaridad negativa ($3' \rightarrow 5'$), se digirió el vector con la enzima de restricción Nde I, se purificó como se describe en la sección 4.9. y se realizó la transcripción con la enzima T7 RNA polimerasa (Promega) (sección 4.12.). Debido a la posición del promotor de la T7 RNA polimerasa en el vector pGEM-T Easy (Promega) y el punto de corte de la enzima de restricción Nde I en dicho vector, la polaridad del RNA transcrito de la región 3D es $3' \rightarrow 5'$. Este RNA transcrito de polaridad negativa se digirió con la enzima RQ1 DNAsa (Promega) y por último se purificó el RNA con el kit RNaseasy (Qiagen).

4.12.- Transcripción de plásmidos

El DNA de los clones infecciosos fue linearizado por digestión con *Nde I*. Los procedimientos para la transcripción *in vitro* ya han sido descritos detalladamente en Baranowski y cols. (1998). La concentración de RNA obtenida se estimó mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio por comparación con cantidades conocidas de RNA ribosómico.

4.13.- Transfección de células BHK-21

Se transfectaron células BHK-21 subconfluentes (70% confluentes) con RNA viral y lipofectina (Gibco) (Sambrook y Russell 2001). Los virus recogidos del sobrenadante de las células transfectadas a las 72 horas post-transfección se multiplicaron mediante dos pases en células BHK-21 (4×10^6 células) con 200 μ l de sobrenadante. Se extrajo RNA del virus procedente del último pase y las regiones genómicas correspondientes fueron amplificadas y secuenciadas para comprobar la presencia de las mutaciones introducidas en el clon infeccioso.

4.14.- Secuenciación de DNA

Para la secuenciación automática del DNA se empleó el *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Abi Prism; Perkin Elmer) y el secuenciador automático ABI373, tal como se ha descrito previamente (Sierra 2001; Pariente y cols. 2003) El análisis de secuencias se llevó a cabo con el paquete DNA Star 4.0 (Lasergene), GeneDoc, y los programas del GCC (Universidad de Wisconsin). Cada secuencia se determinó con al menos dos reacciones independientes de secuenciación. Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación de DNA se detallan en la Tabla 4.1.

4.15.- Tratamiento de las células R con ribavirina

Las células R fueron tratadas durante 72 horas con el agente antiviral ribavirina (Rb) a una concentración de 150 µg/ml. Después de este tratamiento, se lavaron las células con medio DMEM y se subcultivaron tres veces en ausencia de Rb (de la Torre y cols. 1987). Para preparar los medios de cultivo con el agente antiviral se partió de una disolución de Rb en PBS (50 mM) esterilizada por filtración y guardada a -70° C y se diluyó en medio DMEM con 5% de suero bovino fetal (Gibco) para obtener la concentración deseada.

La Rb fue amablemente cedida por el Dr. Juan Carlos de la Torre (Scripps Institute, La Jolla, California, USA).

4.16.- Análisis de los niveles intracelulares de NTPs en células BHK-21 y células R

La cuantificación de los niveles de NTPs intracelulares se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según el protocolo descrito por Pogolotti y Santi con pequeñas modificaciones (Pogolotti y Santi 1982). Se lavaron entre 2 y 4×10^6 células BHK-21 con PBS frío, seguidamente se trataron con 300 µl de ácido tricloroacético (TCA) 0,6 M frío (Carlo Erba Reagenti), y se incubaron en hielo 10 minutos. Se recogieron los 300 µl y se les añadió 240 µl de 1,1,2-triclorotrifluoroetano (Sigma) y 60 µl de tri-n-octylamine (Sigma). Se agitó la mezcla 10 s en el vórtex y se centrifugó durante 30 s a 12000 g y 4° C. La fase superior se

transfirió a otro tubo e inmediatamente se guardó a -80° C. Las muestras fueron analizadas inmediatamente después de ser descongeladas, y se calculó la proporción ATP:ADP, que estuvo siempre por encima de 20, indicando una pérdida mínima del fosfato terminal del ATP durante la preparación de la muestra.

La cuantificación de NTPs fue realizada en un aparato Äkta FPLC estándar empleando una columna Partisil 10 SAX (“Strong Anion eXchanger”) de 4,6 x 250 mm de longitud (Whatman) y una precolumna Partisil 10 SAX de 4,6 x 30 mm de longitud (Phenomenex). Tras lavar la columna con 18 ml de tampón A (7 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 3,8), los nucleótidos fueron eluidos con un gradiente lineal preparado con 45 ml de tampón A (sección 4.18.) y 45 ml de tampón B (sección 4.18.), seguido de un lavado final con 30 ml de tampón B (Pogolotti y Santi 1982). La velocidad de flujo a través de la columna fue de entre 0,65 y 0,82 ml/min y se midió la absorbancia del eluido a 254 nm de forma continua.

Los cromatogramas fueron analizados usando el programa Unicorn 3.00 (Amersham Pharmacia Biotech). Los picos de ATP, CTP, GTP y UTP fueron identificados por comparación con el tiempo de retención observado con soluciones comerciales de nucleótidos. Las concentraciones de todos los nucleótidos se calcularon a partir de curvas estándar obtenidas tras analizar, en las mismas condiciones que las muestras, cantidades conocidas de los distintos NTPs comerciales. El pico de NAD fue proporcional al número de células a partir de las cuales se extrajo la muestra, fue muy reproducible y bien aislado en el cromatograma. Para corregir las fluctuaciones en el número de células, el tamaño de los picos fue normalizado con el pico de NAD de cada muestra (identificado por espectrometría de masas, Airaksinen y cols. 2003).

4.17.- Determinación de la eficacia biológica relativa (“fitness”) de H^5_0 y VR100

La eficacia biológica relativa de estos virus se determinó mediante experimentos de competición en pases seriados entre el virus problema y un virus de referencia (Holland y cols. 1991). En la determinación de la eficacia biológica del VFA VR100 se usó como referencia el virus C^{9}_{22} p50 (Escarmís y cols. 1999), que tiene una eficacia biológica semejante a la del clon C-S8c1 y en la determinación de la eficacia biológica del clon H^5_0 se usó como referencia el virus C^{9}_{22} p150 (Escarmís y cols. 1999), que tiene una eficacia biológica 8,5 veces superior a la del C-S8c1. Se infectaron monocapas de células BHK-21 a una m.d.i. de 0.1 PFUs (o 100 partículas virales por célula) con mezclas del virus problema y el virus de referencia en proporciones conocidas y en las condiciones descritas en la sección 4.3.1. Cuando el e.c.p. fue completo se recogió el sobrenadante de infección, se diluyó 10 veces y se infectó con él una nueva monocapa de células BHK-21. El proceso se repitió hasta un total de 4 infecciones sucesivas (pases). A continuación se extrajo el RNA viral del inóculo inicial y del sobrenadante de infección de cada uno de los pases. La región codificante de 3A-3C de estos RNAs virales se amplificó por RT-PCR cuantitativa a tiempo real ("Light-Cycler") (descrito en la sección 4.10.1.) con la pareja de oligonucleótidos 5531wtnew-3CD1 (que cuantifica específicamente el virus problema presente en la mezcla) y 5531 C^{9}_{22} new-3CD1 (que cuantifica específicamente el virus de referencia presente en la mezcla, C^{9}_{22} p50 o C^{9}_{22} p150) (oligonucleótidos descritos en la Tabla 4.1) y se calculó la proporción de los dos virus en la mezcla. La representación del logaritmo de la proporción de los dos genomas que compiten frente al número de pases nos da el vector de eficacia biológica (Holland y cols. 1991; Duarte y cols. 1992; Escarmís y cols. 1996, 1999). Los vectores de eficacia biológica obtenidos para VR100 y H^5_0 corresponden a las ecuaciones $y = 0,1784e^{1,2362x}$ e $y = 0,0206e^{1,1074x}$, respectivamente (Figura 4.4.). El antilogaritmo de la pendiente del vector se toma como la eficacia biológica del virus problema relativa a la del virus de referencia. Así, el valor de eficacia biológica de VR100 fue de 3,4 veces respecto al virus C^{9}_{22} p50, y por tanto, de 3,4 veces respecto al C-S8c1. El valor de eficacia biológica de H^5_0 fue de 3,0 veces respecto al virus C^{9}_{22} p150, y por tanto, de aproximadamente 26 veces respecto al C-S8c1 (Figura 4.4.).

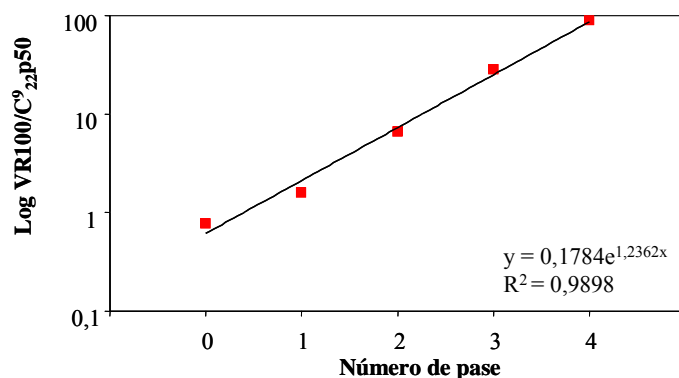
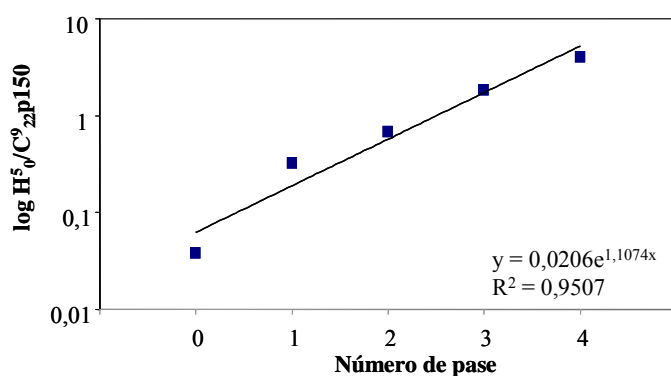
A.**B.**

Figura 4.4. Vectores de eficacia biológica de VR100 y H⁵₀.

A: Vector de eficacia biológica del VFA VR100, relativa al virus de referencia C⁹_{22 p50}, que tiene una eficacia relativa a C-S8c1 de 1 (Escarmís y cols. 1999).

B: Vector de eficacia biológica del VFA H⁵₀, relativa a C⁹_{22 p150}, que tiene una eficacia relativa a C-S8c1 de 8,5 (Escarmís y cols. 1999). Se indican las ecuaciones obtenidas y el coeficiente de regresión (R²).

4.18.- Disoluciones y tampones

- Disolución de Tripsina: 0,5 mg/ml tripsina (Sigma); 0,016 % EDTA (Merck); 0,001 % rojo fenol (Merck), diluidos en PBS.
- PBS (solución salina tamponada con fosfato): 137 mM NaCl (Merck); 2,7 mM KCl (Merck); 1,5 mM Na₂HPO₄ (Merck).
- Tampón A de cromatografía de afinidad: 7 mM NH₄H₂PO₄ pH 3,8 (Fluka).
- Tampón B de cromatografía de afinidad: 250 mM NH₄H₂PO₄ pH 4,5 (Fluka); 500 mM KCl (Fluka).
- Tampón fosfato pH 6,0: 12 mM HNa₂PO₄ (Merck); 88 mM H₂NaPO₄ (Merck).
- TAE: 40 mM Tris-acetato pH 8,3 (Sigma); 1 mM EDTA (Merck).

Resultados

5.- Resultados

5.1.- Establecimiento de dos nuevas líneas celulares independientes persistentemente infectadas por VFA

En nuestro laboratorio se puso a punto un sistema modelo de persistencia del VFA en cultivos de células BHK-21 (de la Torre y cols. 1985, 1988; Díaz y cols. 1990; Martín-Hernández y cols. 1994). La observación de una proporción de células BHK-21 o IBRS-2, estimada en 10^{-3} a 10^{-4} , que sobreviven a una infección lítica por el VFA, facilitó el establecimiento de cultivos de células BHK-21 persistentemente infectadas con virus C-S8c1 (de la Torre y cols. 1985), definiéndose una coevolución del sistema virus-célula durante la persistencia. Este sistema modelo de persistencia de VFA ha sido estudiado con detalle en nuestro laboratorio (de la Torre y cols. 1985, 1988, 1989a, b; Díez y cols. 1989; Martín Hernández y cols. 1994; Sáiz y Domingo 1996).

En la primera parte de esta Tesis Doctoral se establecieron dos nuevas líneas celulares independientes de BHK-21 persistentemente infectadas con C-S8c1, con el objetivo de caracterizar, mediante las técnicas de las que se dispone en la actualidad, la dinámica del RNA viral intracelular y extracelular durante la persistencia y estudiar si se repite la coevolución del virus y las células observadas anteriormente en un proceso evolutivo independiente, iniciado con los mismos componentes celulares y víricos, en el mismo ambiente.

Para ello se infectaron monocapas confluentes de BHK-21 con C-S8c1 a una multiplicidad de infección (m.d.i.) de 0,1 unidades formadoras de placa (UFPs)/célula (Figura 5.1.). A las 24 horas postinfección (h.p.i.) se observó un efecto citopático (e.c.p.) generalizado caracterizado por redondeamiento y desprendimiento masivo de células. Sin embargo, algunas células permanecieron adheridas a la superficie de la placa. A las 48 h.p.i. se lavaron las monocapas de células y se les suministró medio DMEM suplementado con 5% de suero bovino fetal. El índice de supervivencia celular observado, al igual que en trabajos anteriores (de la Torre y cols. 1985), fue estimado en 10^{-3} . El medio se renovó cada 3-4 días para facilitar el crecimiento celular hasta obtener monocapas confluentes. Las monocapas se infectaron por segunda vez a una m.d.i. de 0,1 UFPs/célula. A las 24 horas de observarse e.c.p. se lavaron las células y se suministró medio DMEM suplementado con 5% de suero bovino fetal hasta formarse

una nueva monocapa. Una vez establecidas estas líneas celulares independientes BHK-RB y BHK-RD (denominadas células RB y RD), las células pudieron ser pasadas, congeladas, descongeladas y subcultivadas nuevamente, siguiendo los procedimientos habituales (de la Torre y cols. 1985). El tratamiento de las células R con el agente antiviral ribavirina (Rb) (1- β -D ribofuranosil-1, 2, 4, -triazol-3-carboxamida) (de la Torre y cols. 1987) permite eliminar el virus de las mismas, manteniendo la viabilidad celular. Las células tratadas con Rb y de las que se ha eliminado el virus reciben el nombre de células R curadas con Rb (células R-Rb).

En esta Tesis Doctoral se ha alcanzado el pase 100 en ambas líneas celulares con el objetivo de analizar los cambios fenotípicos y genotípicos de las células R y los virus durante la persistencia.

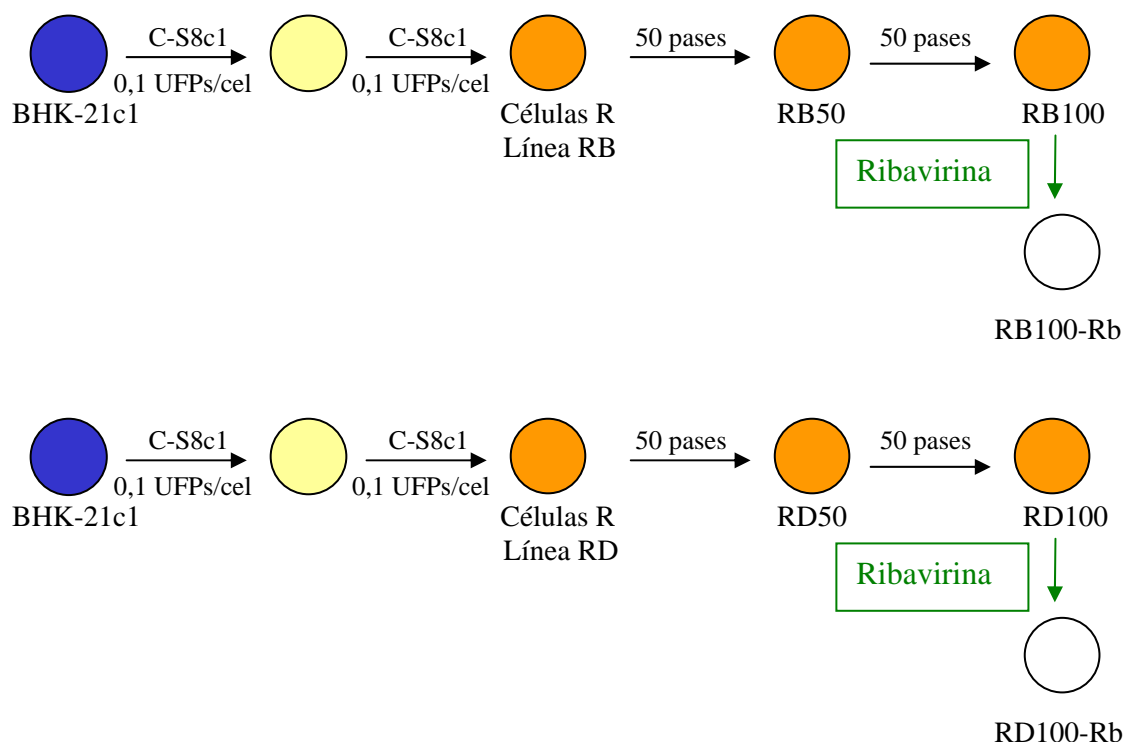


Figura 5.1. **Establecimiento de dos líneas celulares independientes (denominadas línea RB y línea RD) persistentemente infectadas por C-S8c1.** Las circunferencias azules representan las monocapas confluentes de BHK-21. Las circunferencias amarillas representan células BHK-21 que han sobrevivido a la infección con C-S8c1 y son capaces de formar una nueva monocapa. Las circunferencias naranjas representan las células R persistentemente infectadas por C-S8c1, que han sido pasadas hasta 100 veces (RB100 y RD100). Las circunferencias blancas representan las células R curadas mediante tratamiento con el agente antiviral ribavirina (RB100-Rb y RD100-Rb).

5.2.- Crisis de efecto citopático de las células R

Tras alcanzar la confluencia, en ocasiones las monocapas de células R mostraron crisis de e.c.p., con masiva muerte celular e incremento del título del virus en el medio de cultivo. Este fenómeno ya había sido descrito en trabajos previos de nuestro laboratorio (de la Torre y cols. 1985). Las crisis se minimizaron subcultivando las células justo al alcanzar la confluencia, con el fin de evitar la fuerte selección de subpoblaciones celulares a lo largo de los pases. A pesar de ello, no se puede descartar que la muerte celular en crisis poco aparentes contribuya a la evolución celular en el curso de la persistencia.

En general, las crisis de e.c.p. se observaron menos frecuentemente a medida que aumentó el número de pase de las células. Aunque en determinados momentos, como el pase 45, en el que se observa un incremento tanto de infectividad como de moléculas de RNA viral intra y extracelulares, estas crisis de e.c.p. se acentúan. Estas observaciones sugieren que una parada de la división celular en las monocapas confluentes puede contribuir a inducir la entrada del sistema en infección lítica.

5.3.- Alteraciones morfológicas y de crecimiento de las células R

5.3.1.- Cambios morfológicos en las células R

A lo largo de los diferentes pases de las células R se puede observar un cambio en la morfología celular respecto a las células BHK-21 parentales (Figura 5.2.) (de la Torre y cols. 1988). Esta alteración celular no puede atribuirse simplemente al hecho de pasar seriadamente las células, ya que células BHK-21 pasadas seriadamente hasta 50 veces presentan el mismo aspecto fusiforme que las BHK-21 iniciales. Las diferencias morfológicas más significativas que se pueden apreciar mediante microscopía óptica son:

1. Morfología redondeada de las células R. Contrariamente a las células BHK-21, las células R van adquiriendo con los pases una morfología más redondeada.

2. Distribución celular en la monocapa. Las células BHK-21 se disponen en haces alargados manteniendo una distribución ordenada característica, mientras que las células R presentan una distribución desordenada.

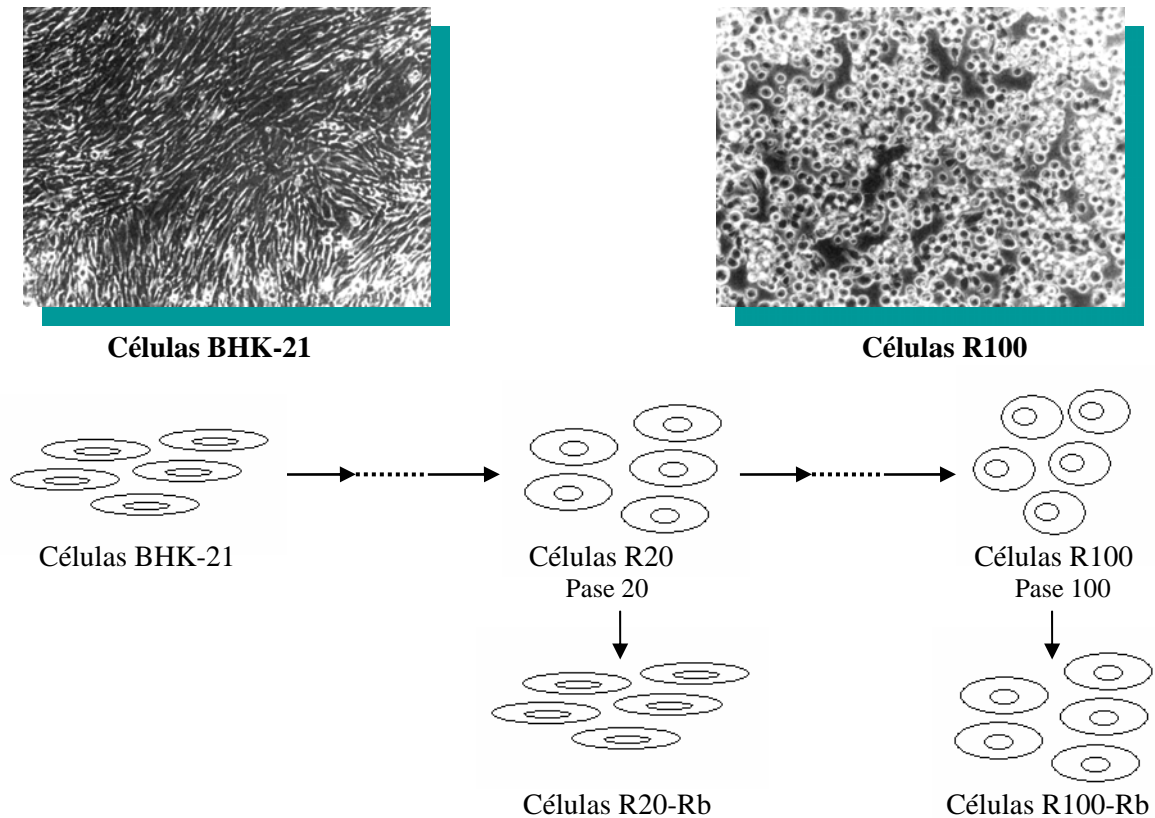


Figura 5.2. **Evolución de la morfología de las células R.** Uno de los cambios fenotípicos que adquieren las células R a medida que aumenta el número de pase es la morfología redondeada en lugar de la morfología fusiforme inicial. Células R-Rb de pases tempranos presentan una morfología prácticamente indistinguible de la de células BHK-21. Células R-Rb de pases tardíos presentan una morfología intermedia entre la que corresponda al pase de persistencia del que procede y la de células BHK-21.

Las células R curadas con Rb recuperan la morfología típica de las BHK-21 iniciales en distinto grado, en función del número de pase de persistencia. Células R curadas con Rb en pases tempranos presentan una morfología prácticamente indistinguible de la de células BHK-21, en cambio, células R curadas en pases tardíos presentan una morfología intermedia entre la que corresponda al pase de persistencia del que procede y la de células BHK-21. Esta observación sugiere la selección de subpoblaciones celulares morfológicamente distintas de las parentales.

5.3.2.- Aumento del índice de crecimiento y disminución de la inhibición por contacto

A lo largo de la persistencia con el VFA se seleccionan células de crecimiento más rápido que las parentales. La Figura 5.3. muestra las curvas de crecimiento de células BHK-21 (pase 25) y células R (serie RB y RD) de los pases 2, 45 y 100. Se sembraron 10^5 células de cada muestra en placas p35 (número estimado por conteo con hemocitómetro). Tras 12 horas (para permitir que las células se adhirieran a la superficie de la placa) se determinó el número de células al que se asigna el tiempo cero. En cada punto (12, 18, 24, 36, 42, 48, 60 y 72 horas post-siembra) se determinó el número de células relativo al tiempo cero. Las células RB2 y RD2 tienen un comportamiento muy parecido al de células BHK-21; en cambio, a medida que aumenta el número de pase también lo hace el índice de crecimiento celular, como muestran las curvas de crecimiento de células RB y RD de los pases 45 y 100. Dichas curvas sugieren también que las células R de pases tardíos muestran menor inhibición de crecimiento por contacto celular.

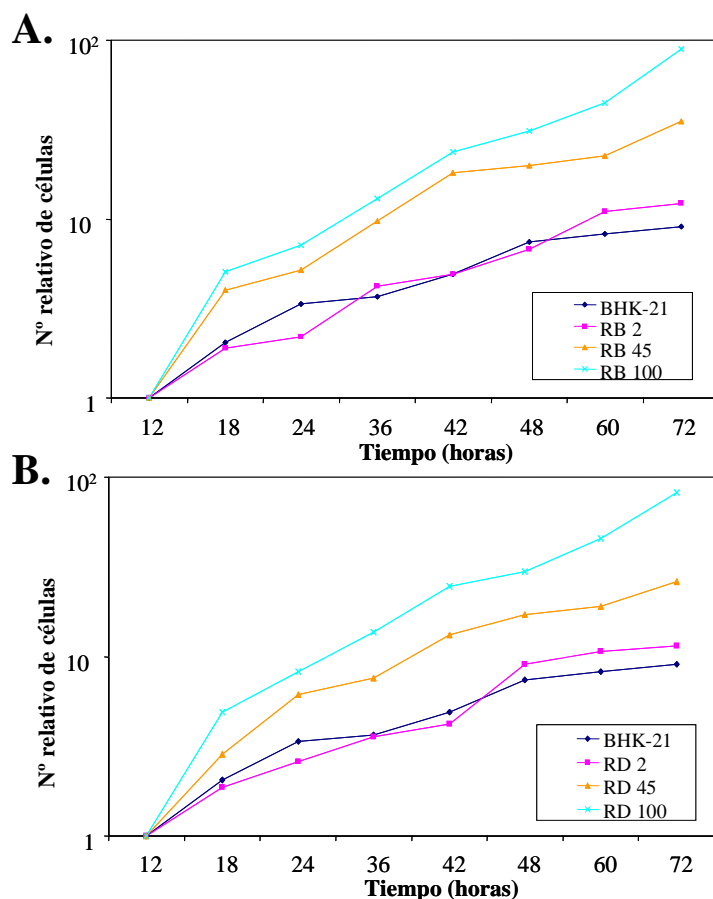


Figura 5.3. Curvas de crecimiento de células BHK-21, células RB y RD de los pases 2, 45 y 100. Las partes A y B de la figura representan las curvas de crecimiento de células BHK-21 y células R de las series B y D, respectivamente. El número relativo de células corresponde al cociente entre el número de células obtenido en cada tiempo y el obtenido a tiempo 0 (12 horas post-siembra). El número de células de cada punto se determinó por duplicado mediante conteo con el hemocitómetro. La figura representa los valores medios.

5.4.- Evolución de la infectividad durante la persistencia

Para estudiar la evolución de la carga viral durante la persistencia, se determinó la infectividad extracelular (UFPs en el medio de cultivo de ambas líneas celulares), e intracelular (UFPs intracelulares), mediante ensayos de plaqueo en medio de agar semisólido en células BHK-21, a lo largo de cien pases de las dos nuevas líneas de persistencia. Se recogieron muestras de células R en confluencia que no presentaban entrada en crisis de efecto citopático y del medio de cultivo de dichas células.

La Figura 5.4. representa las UFPs totales en el medio de cultivo de cada placa p100 (aproximadamente 6×10^6 células en 15 ml de medio de cultivo) (UFPs ec/p100) de células R confluentes, y las UFPs intracelulares correspondientes también a una placa p100 confluyente de células R (UFPs ic/p100).

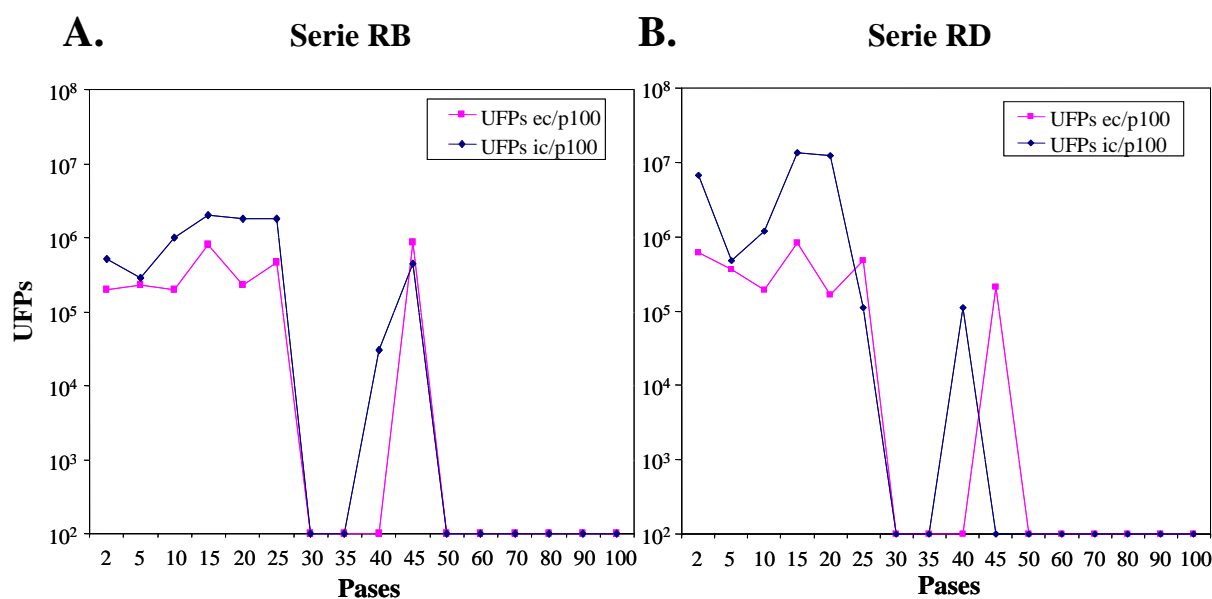


Figura 5.4. Evolución de la infectividad de virus extracelular e intracelular durante persistencia del VFA en células BHK-21. Las partes A y B representan la infectividad en las líneas RB y RD, respectivamente. La línea azul representa las UFPs intracelulares correspondientes a 6×10^6 células R (placa p100 confluyente). La línea rosa representa las UFPs extracelulares correspondientes a los 15 ml de medio de cultivo de 6×10^6 células R (placa p100 confluyente). El límite de detección de la infectividad de las muestras fue de 7 UFPs/ml. Las determinaciones se hicieron por duplicado. Los puntos representan los valores medios.

En ambas líneas celulares, líneas RB y RD, la evolución de la infectividad intra y extracelular fue muy similar. Se detectó VFA con un título elevado durante los 25 primeros pases, y, sorprendentemente, en el pase 30 de ambas líneas celulares se observa una pérdida paralela de infectividad de virus intra y extracelular, que se recupera en el pase 40 (virus intracelular) y pase 45 (virus extracelular). El pico de infectividad se corresponde con un incremento de crisis de e.c.p. observado en el pase 45. Sin embargo, la infectividad vuelve a ser indetectable mediante ensayos de plaqueo en medio de agar semisólido hasta el pase 100.

5.5.- Evolución de la proporción de moléculas de RNA vírico de polaridad positiva y negativa durante la persistencia

5.5.1.- Diseño de la estrategia de cuantificación de moléculas de RNA específico de banda

La cuantificación de moléculas de RNA de polaridad positiva y polaridad negativa del VFA se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real con el aparato “Light Cycler” (Roche), tras un paso previo de RT tal como se describe en Materiales y Métodos (sección 4.10.2.). La región amplificada fue 3D (altamente conservada entre los distintos serotipos del VFA). El límite de detección de esta RT-PCR cuantitativa es $1,8 \times 10^2$ moléculas de RNA por muestra.

La cuantificación de RNA de las muestras se determinó por extrapolación de los valores de fluorescencia obtenidos en una curva patrón realizada en paralelo con RNA de polaridad positiva (RNA transcrito de cadena positiva a partir de pMT28) o negativa (RNA transcrito de cadena negativa de la región 3D a partir de pMT28).

Para comprobar que la cuantificación de cadena negativa es específica, se amplificaron las curvas estándar de cadena positiva y negativa mediante la estrategia de amplificación de cadena negativa. Únicamente se obtuvo producto amplificado en el caso de la curva estándar de cadena negativa; además, el número de moléculas de RNA obtenido se correspondía con el número de moléculas esperado. Por tanto, se puede concluir que la estrategia de cuantificación es específica de banda.

5.5.2.- El RNA celular no interfiere en la cuantificación del RNA vírico intracelular

Para comprobar que el RNA celular no interfería en la cuantificación del RNA vírico intracelular se hizo una curva de calibrado mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Materiales y Métodos, sección 4.10.1.) cuantificando dos tipos de muestras: mezclas de cantidades decrecientes de RNA transcrito del cDNA infeccioso del VFA, pMT28, con una cantidad fija de RNA de BHK-21 (3×10^5 células/ μ l RNA) (Tabla 5.1. A), y mezclas de una cantidad fija de RNA de pMT28 ($1,8 \times 10^4$ moléculas RNA/ μ l) con cantidades variables de RNA celular (Tabla 5.1. B). Este último experimento se repitió con mezclas de otras dos cantidades fijas de RNA de pMT28 ($1,8 \times 10^5$ moléculas RNA/ μ l y $1,8 \times 10^3$ moléculas RNA/ μ l) y cantidades variables de RNA celular, sin observarse modificación de las cuantificaciones de RNA vírico (resultados no mostrados).

En todos los casos el número de moléculas de RNA viral obtenido se corresponde con el número de moléculas esperado, por lo que podemos concluir que el RNA de BHK-21 no interfiere en la cuantificación del RNA viral intracelular.

Tabla 5.1. Curva de calibrado en Light Cycler.

A.

Muestras		Moléculas RNA viral ic/ μ l esperadas	Moléculas RNA viral ic/ μ l obtenidas
pMT28 dilución 10^{-2}		$1,8 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
pMT28 dilución 10^{-3}		$1,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$
pMT28 dilución 10^{-4}		$1,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$
pMT28 dilución 10^{-5}		$1,8 \times 10^4$	$9,3 \times 10^3$
pMT28 dilución 10^{-6}		$1,8 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$
pMT28 dilución 10^{-7}		$1,8 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$
pMT28 dilución 10^{-2}	+ 1 μ l RNA BHK-21	$1,8 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
pMT28 dilución 10^{-3}	+ 1 μ l RNA BHK-21	$1,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
pMT28 dilución 10^{-4}	+ 1 μ l RNA BHK-21	$1,8 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4$
pMT28 dilución 10^{-5}	+ 1 μ l RNA BHK-21	$1,8 \times 10^4$	$5,8 \times 10^3$
pMT28 dilución 10^{-6}	+ 1 μ l RNA BHK-21	$1,8 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
pMT28 dilución 10^{-7}	+ 1 μ l RNA BHK-21	$1,8 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$

B.

Muestras	Moléculas RNA viral ic/μl esperadas	Moléculas RNA viral ic/μl obtenidas
pMT28 dilución 10^{-2}	$1,8 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
pMT28 dilución 10^{-3}	$1,8 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
pMT28 dilución 10^{-4}	$1,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
pMT28 dilución 10^{-5}	$1,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
pMT28 dilución 10^{-6}	$1,8 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
pMT28 dilución 10^{-7}	$1,8 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$
1μl RNA pMT28 dil 10^{-5} + 2μl RNA BHK-21	$1,8 \times 10^4$	$2,4 \times 10^3$
1μl RNA pMT28 dil 10^{-5} + 1μl RNA BHK-21	$1,8 \times 10^4$	$9,1 \times 10^3$
1μl RNA pMT28 dil 10^{-5} + 0,5μl RNA BHK-21	$1,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
1μl RNA pMT28 dil 10^{-5} + 0,25μl RNA BHK-21	$1,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$

A: curva patrón. B: mezclas de RNA de pMT28 y RNA celular. Como blanco se empleó RNA de MS2 10ng/μl (RNA inespecífico).

5.5.3.- Ausencia de interferencia de moléculas de RNA positivas en la cuantificación del RNA de cadena negativa

Para asegurar que no existe formación de moléculas intermedias de doble banda entre cadenas positivas y negativas, que podrían impedir el acceso e hibridación del iniciador a la cadena diana durante el paso de RT, se cuantificaron distintas cantidades conocidas de moléculas de RNA de cadena negativa (RNA de cadena negativa utilizado para determinar la curva estándar) en presencia de 10^7 moléculas de RNA de cadena positiva (RNA de cadena positiva utilizado para determinar la curva estándar) (Tabla 5.2.).

Tabla 5.2. Cuantificación de diluciones seriadas de moléculas de RNA de cadena negativa en presencia de RNA de cadena positiva (10^7 moléculas RNA +/ μ l).

<u>Muestras</u>		Moléculas RNA -/ μ l	Moléculas RNA -/ μ l
Moléculas RNA -/ μ l	Moléculas RNA +/ μ l	esperadas	obtenidas
$2,2 \times 10^8$	$+ 1,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$8,9 \times 10^7$
$2,2 \times 10^7$	$+ 1,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$6,7 \times 10^6$
$2,2 \times 10^6$	$+ 1,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
$2,2 \times 10^5$	$+ 1,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$
$2,2 \times 10^4$	$+ 1,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
$2,2 \times 10^3$	$+ 1,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$

Se prepararon mezclas de cantidades conocidas de RNA de cadena negativa y una elevada cantidad de RNA de cadena positiva (10^7 moléculas +/ μ l) y se cuantificaron las moléculas de RNA de cadena negativa. Las determinaciones se hicieron por duplicado. La tabla indica los valores medios. En todos los casos el número de moléculas obtenido está por encima del control negativo. La especificidad de las reacciones de amplificación se comprobó con el análisis de la curva de fusión del DNA amplificado en el Light Cycler y mediante electroforesis en gel de agarosa.

La cantidad obtenida de moléculas de RNA de cadena negativa de las mezclas coincide con la cantidad esperada, por tanto se puede concluir que no se observa efecto inhibitorio del RNA de cadena positiva en la cuantificación de RNA de cadena negativa.

5.5.4.- Cuantificación de moléculas de RNA positivas y negativas de VFA (no persistente)

Se aplicó el método de cuantificación de cadenas de RNA de polaridad positiva y negativa a progenie extracelular de VFA C-S8c1, MARLS y H⁵₉₅ (Tabla 5.3.). Los resultados muestran del orden de 1000 veces menos cadena negativa que positiva en los preparados ensayados.

Tabla 5.3. Moléculas de RNA positivas y negativas en el sobrenadante de BHK-21 infectadas con VFA.

	Moléculas RNA positivas/ μ l sn	Moléculas RNA negativas/ μ l sn
C-S8c1	$4,1 \times 10^7$	$6,3 \times 10^4$
MARLS	$6,2 \times 10^7$	$7,5 \times 10^4$
H⁵₉₅	$1,8 \times 10^7$	$5,7 \times 10^4$

Número de moléculas de RNA de polaridad positiva y de polaridad negativa por μ l de sobrenadante de células BHK-21 infectadas con C-S8c1, MARLS ó H⁵₉₅. Las determinaciones se hicieron por duplicado. La tabla indica los valores medios. En todos los casos el número de moléculas obtenido está por encima del control negativo. La especificidad de las reacciones de amplificación se comprobó con el análisis de la curva de fusión del DNA amplificado en el Light Cycler y mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se cuantificaron también las moléculas de RNA positivas y negativas de una muestra de VFA C-S8 purificado (Tabla 5.4.). La diferencia entre los niveles de cadenas positivas y negativas en C-S8 purificado son mayores que en el caso de muestras de sobrenadante de células infectadas por el mismo virus, alcanzando casi un exceso de 10^6 veces el RNA de polaridad positiva respecto al de polaridad negativa.

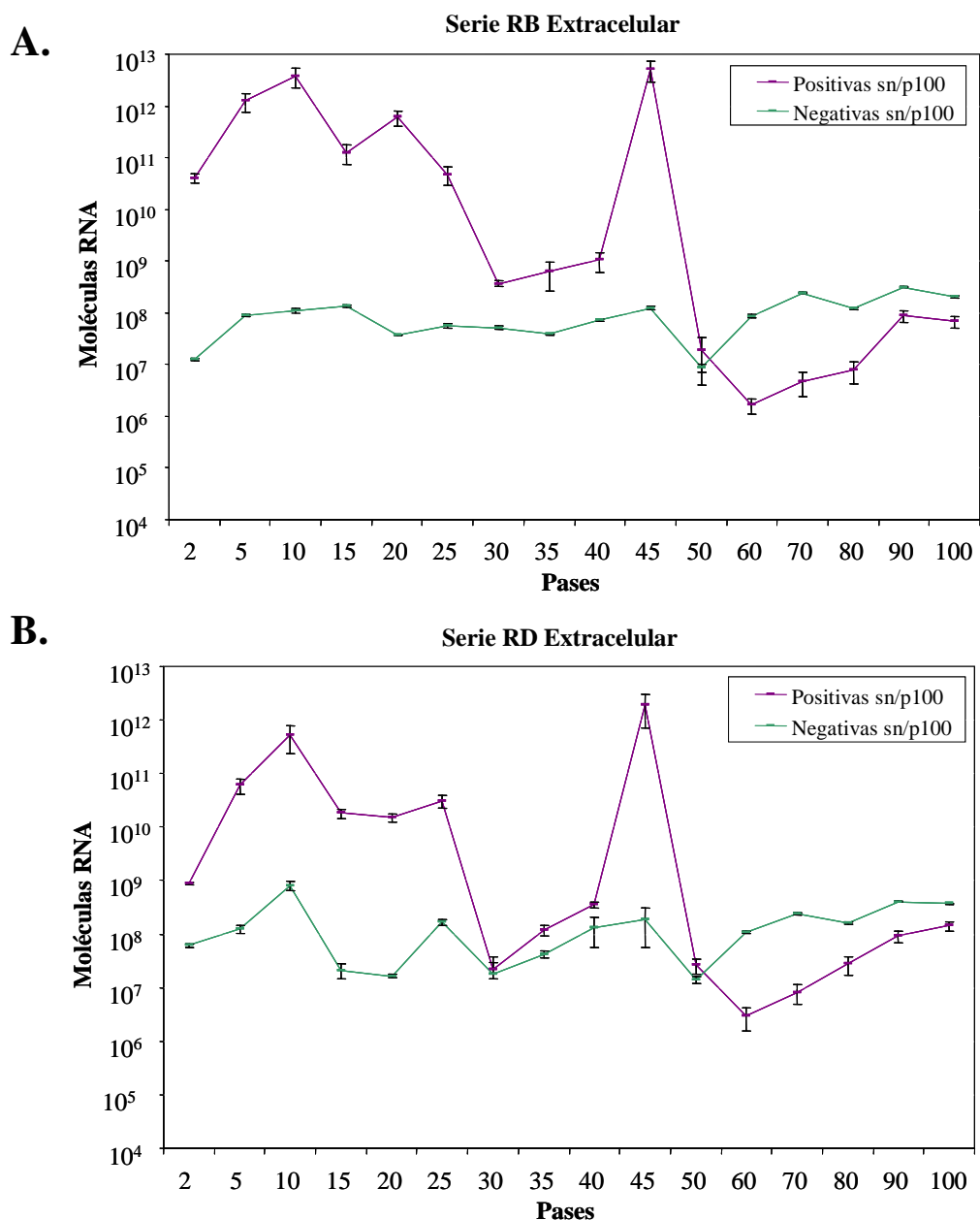
Tabla 5.4. Moléculas de RNA positivas y negativas de C-S8 purificado.

	Moléculas RNA positivas/ μ l sn	Moléculas RNA negativas/ μ l sn
C-S8 purificado	$4,8 \times 10^9$	$6,1 \times 10^3$

El virus se purificó tal como se describe en Domingo y cols. 1980 con las modificaciones detalladas en Materiales y Métodos (sección 4.5.). Las determinaciones se hicieron por duplicado. La tabla indica los valores medios. En todos los casos el número de moléculas obtenido está por encima del control negativo. La especificidad de las reacciones de amplificación se comprobó con el análisis de la curva de fusión del DNA amplificado en el Light Cycler y mediante electroforesis en gel de agarosa.

5.5.5.- Cuantificación de moléculas de RNA positivas y negativas durante la persistencia de VFA en células BHK-21

Una vez completados los controles descritos anteriormente, se determinó el número de moléculas de RNA positivas y negativas extracelulares e intracelulares durante la persistencia de VFA (Figura 5.5.). En ella se representa el número de moléculas de RNA positivas y negativas extracelulares e intracelulares por placa p100 confluyente de células R (aproximadamente 6×10^6 células).



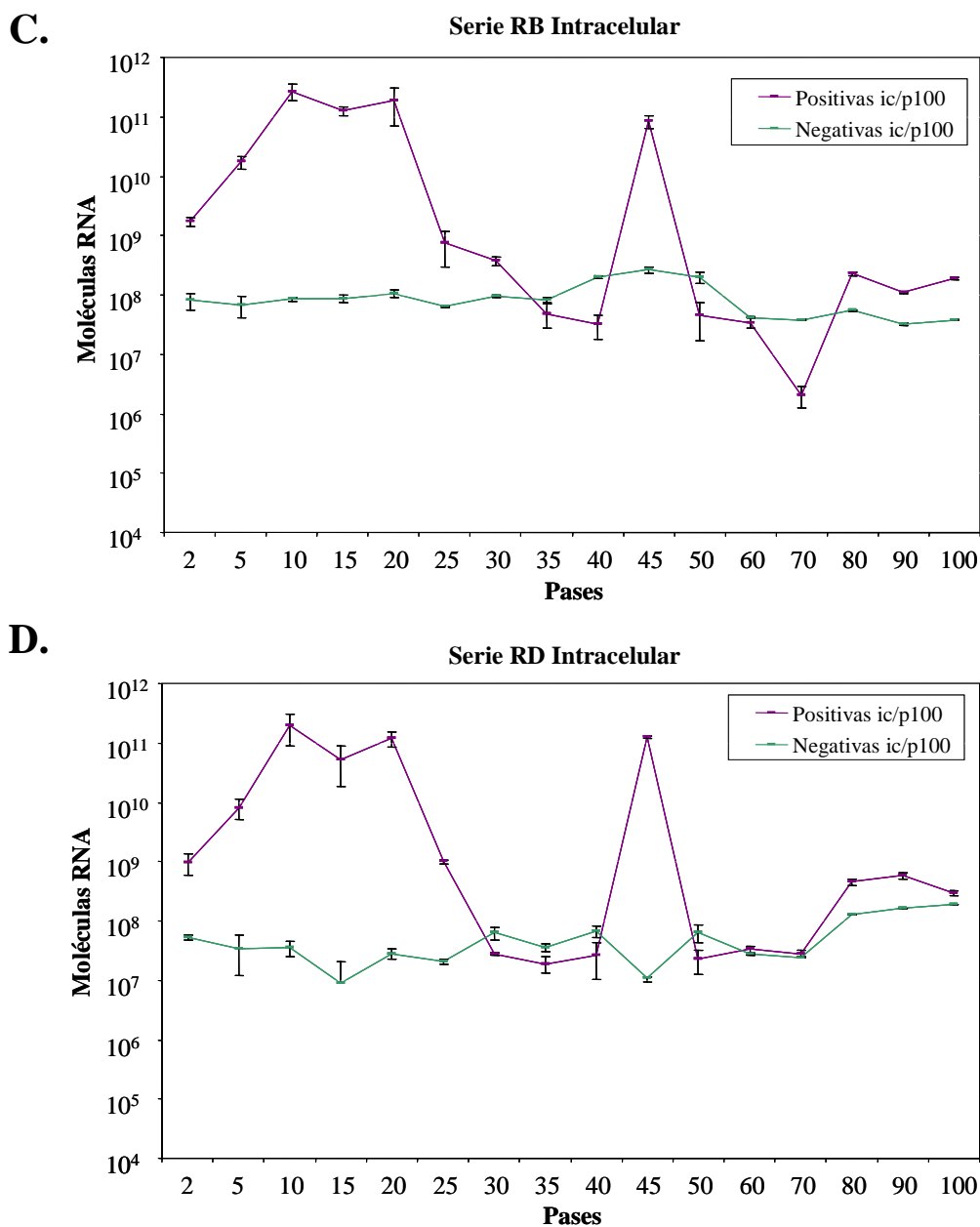


Figura 5.5. Evolución de las moléculas de RNA positivas y negativas extra e intracelulares durante la persistencia. Las partes A (serie RB) y B (serie RD) corresponden a la cuantificación de moléculas de RNA extracelulares. Las partes C (serie RB) y D (serie RD) corresponden a la cuantificación de moléculas de RNA intracelulares. Las líneas morada y verde representan las moléculas de RNA positivas y negativas respectivamente correspondientes a 6×10^6 células R (placa p100 confluyente). Se llevaron a cabo dos reacciones independientes de RT de cada una de las muestras y tres reacciones independientes de PCR cuantitativa a tiempo real a partir de cada uno de los cDNA. La figura representa los valores medios y las desviaciones estándar. En todos los casos el número de moléculas obtenido está por encima del control negativo. La especificidad de las reacciones de amplificación se comprobó con el análisis de la curva de fusión del DNA amplificado en el Light Cycler y mediante electroforesis en gel de agarosa.

Una vez más, la evolución en las dos líneas independientes de persistencia es muy paralela. El nivel de moléculas de RNA negativas se mantuvo aproximadamente constante a lo largo de los pases, mientras que el de cadenas positivas sufrió grandes oscilaciones.

En la fase inicial de la persistencia el nivel de cadenas positivas de RNA es muy superior al de cadenas negativas. Entre el pase 30 y 40 la diferencia disminuye considerablemente. Esta caída del número de moléculas de RNA positivas coincide con la pérdida de infectividad del virus extracelular en estos pases. En el pase 45 hay un pico de moléculas de RNA positivas, que de nuevo se corresponde con un pico de infectividad del virus extracelular en este pase. A partir del pase 50 el nivel de cadenas negativas extracelulares supera al de positivas, y se mantiene así hasta el pase 100. Se puede apreciar que en aquellos pases en los que disminuye drásticamente el número de moléculas de RNA positivas, incluso siendo superadas en algunos casos por el nivel de cadenas negativas, no se detecta infectividad al realizar ensayos de plaqueo.

Es posible que la disminución de cadenas de RNA de polaridad positiva refleje una de las consecuencias de la coevolución virus-célula, y que el mantenimiento de un nivel de moléculas de RNA positivas inferior al de negativas contribuya a la persistencia del virus.

5.5.6.- Comprobación del pico de moléculas de RNA de cadena positiva del pase 45

Para confirmar que el pico de moléculas de RNA positivas del pase 45 no es producto del estadio celular en el momento en que se recogieron tanto el virus extracelular como el intracelular, es decir, que no se debe a que las muestras virales se recogieron justo cuando el sistema estaba a punto de entrar en crisis de efecto citopático, se tomaron muestras de sobrenadante y células a distintos grados de confluencia: 95%, 100% y ligeramente superior al 100% pero sin llegar a mostrar crisis de efecto citopático del pase 45. Se cuantificaron las moléculas de RNA de cadena positiva extracelulares e intracelulares de las muestras y se comprobó la existencia de un pico de moléculas de RNA en el pase 45 en todas las muestras ensayadas (Figura 5.6.).

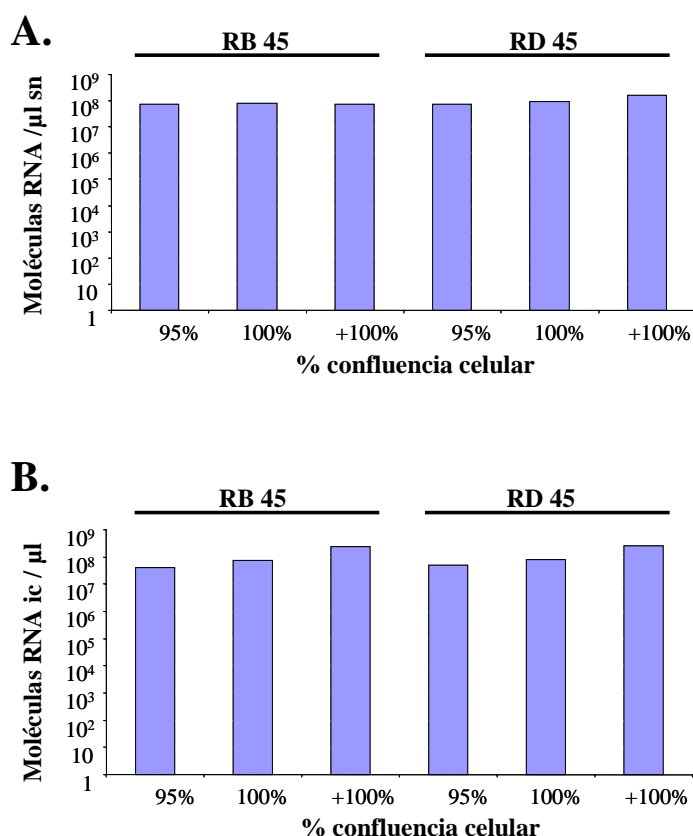


Figura 5.6. Moléculas de RNA de cadena positiva extra e intracelulares de células R45 (RB y RD) a distintos grados de confluencia celular. La parte A representa las moléculas de RNA de cadena positiva extracelulares/ μ l de sobrenadante de células R. La parte B representa las moléculas de RNA de cadena positiva intracelulares/ μ l de células R. Las tres primeras columnas corresponden a la serie RB (95 % de confluencia, 100% de confluencia y ligeramente pasada la confluencia sin llegar a observar crisis de efecto citopático).

Las tres siguientes columnas corresponden a la serie RD (95 % de confluencia, 100% de confluencia y ligeramente pasada la confluencia sin llegar a observar crisis de efecto citopático). Las determinaciones se hicieron por duplicado. Las figuras representan los valores medios. En todos los casos el número de moléculas obtenido está por encima del control negativo. La especificidad de las reacciones de amplificación se comprobó con el análisis de la curva de fusión del DNA amplificado en el Light Cycler y mediante electroforesis en gel de agarosa.

La diferencia en la cuantificación de moléculas de RNA positivas entre la muestra del pase 45 tomada al 95% de confluencia celular y la muestra del pase 45 ligeramente pasada la confluencia, es mínima. El resultado de la cuantificación es del orden de 3-4 logaritmos superior al de los pases 40 y 50 (pases anterior y posterior analizados). Por tanto, se puede concluir que el pico observado en el pase 45 corresponde a un estado replicativo del virus en la célula persistentemente infectada y no se debe al estado de confluencia celular.

5.5.7.- Origen celular o vírico del factor que mantiene el nivel de cadenas negativas superior al de positivas

Durante la persistencia, las células hospedadoras se hacen progresivamente más resistentes al VFA y éste, a su vez, más virulento para las células iniciales, lo que refleja una coevolución del virus y la célula en este sistema (de la Torre y cols. 1988).

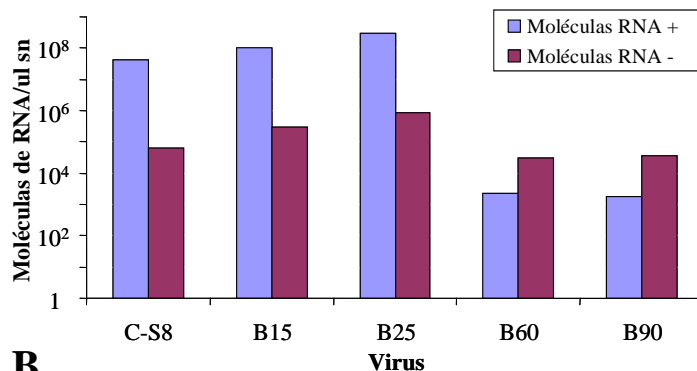
Es posible que, como resultado de esta coevolución, el virus tenga alteradas regiones de su genoma responsables de regular los niveles de cadena positiva y negativa, o que sean las células las causantes de que el nivel de cadenas negativas supere al de positivas.

Para determinar si el factor que mantiene el nivel de cadenas negativas superior al de positivas es viral o celular se realizaron dos tipos de infecciones:

1. Se infectaron células BHK-21 con virus R extracelular de pases en los que el número de las cadenas positivas era superior al de las negativas (pases 15 y 25, Figura 5.5.) o viceversa (pases 60 y 90, Figura 5.5.) en ambas series.
2. Se infectaron células R curadas con ribavirina de pases en los que el nivel de cadenas negativas en el sobrenadante era superior al de positivas (pases 90 y 100, Figura 5.5.) con virus R extracelular de pases en los que las cadenas positivas eran superiores a las negativas (pases 5 y 15, Figura 5.5.) o viceversa (pases 60 y 70, Figura 5.5.).

Como muestra la Figura 5.7., virus que en persistencia mantienen un determinado nivel de cadenas positivas, superior (C-S8c1 y virus R de pases 15 y 25) o inferior (pases 60 y 90) al de cadenas negativas, mantienen dicho nivel tras infectar BHK-21. Por tanto, el factor responsable de que las cadenas negativas superen a las positivas sería viral. Este resultado sugiere que los virus R han evolucionado y se han seleccionado variantes capaces de mantener bajo el nivel de cadenas positivas, incluso inferior al de negativas.

A.



B.

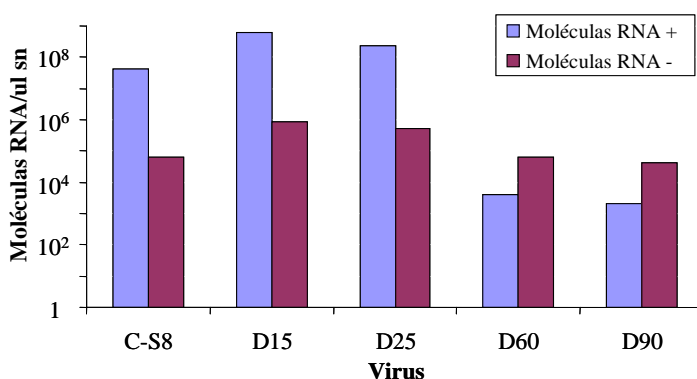


Figura 5.7. Determinación del número de moléculas de RNA de polaridad positiva y negativa en el sobrenadante de infecciones de células BHK-21 con C-S8c1 y virus R (pases 15, 25, 60 y 90) de las series RB y RD. La gráfica A representa las moléculas de RNA positivas y negativas en el sobrenadante de células BHK-21 infectadas con C-S8c1 y virus R de la serie B. La gráfica B representa las moléculas de RNA positivas y negativas en el sobrenadante de células BHK-21 infectadas con C-S8c1 y virus R de la serie D. Las barras azules corresponden a las moléculas de RNA positivas/μl de sobrenadante.

Las barras moradas corresponden a las moléculas de RNA negativas/μl de sobrenadante. Las determinaciones se hicieron por duplicado. Las figuras indican los valores medios. En todos los casos el número de moléculas obtenido está por encima del control negativo. La especificidad de las reacciones de amplificación se comprobó con el análisis de la curva de fusión del DNA amplificado en el Light Cycler y mediante electroforesis en gel de agarosa.

Por otra parte, cuando se infectan células R curadas con ribavirina, provenientes de pases en los que las cadenas de RNA negativas superan a las positivas, con virus que en persistencia presentan un nivel de cadenas negativas superior al de positivas (pases 60 y 70), los virus mantienen dicho nivel tras la infección, incluso parece que aumenta ligeramente la relación de cadenas negativas respecto a positivas. En cambio, virus R de pases en los que las cadenas positivas son claramente superiores a las negativas (C-S8c1 y virus R de pases 5 y 15) reducen la diferencia entre el nivel de cadenas positivas y negativas, llegando incluso a ser superiores las negativas (serie B, virus B15) (Figura 5.8.). Por tanto, también existiría un factor celular responsable de que las cadenas negativas superen a las positivas.

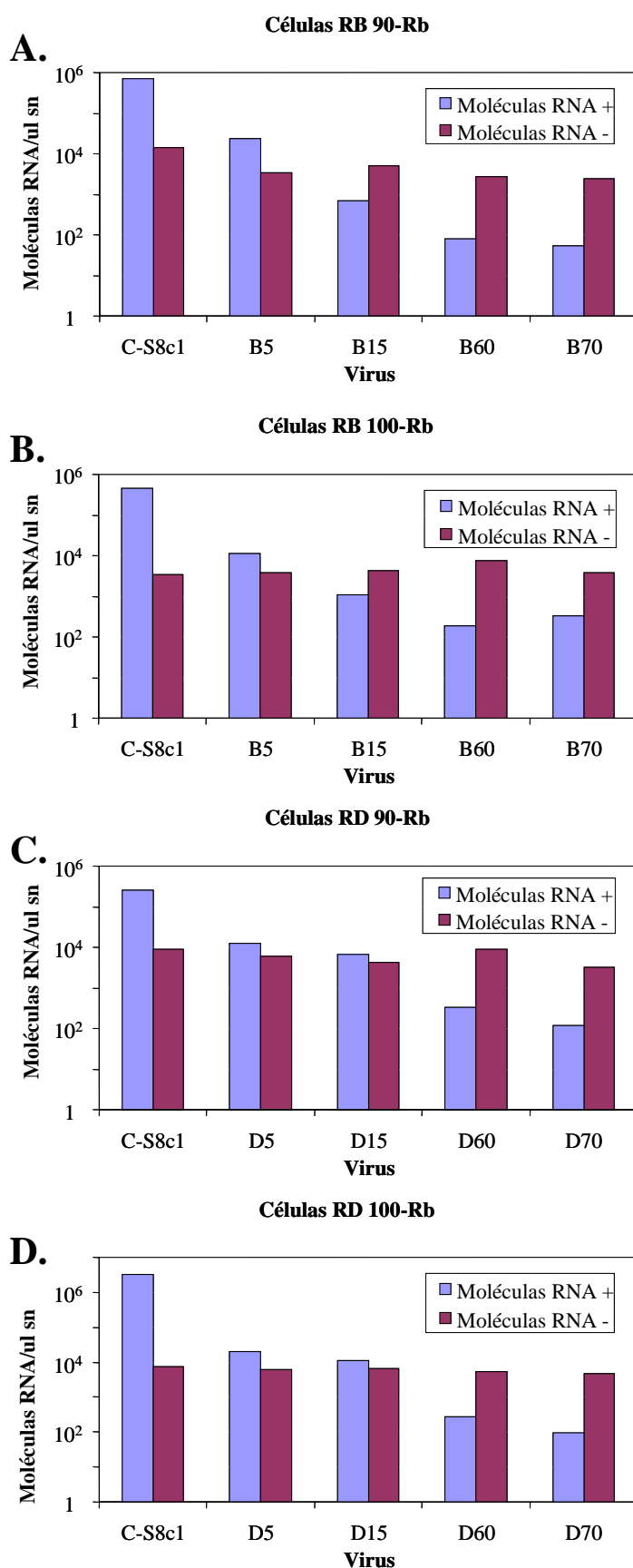


Figura 5.8. **Determinación del número de moléculas de RNA positivas y negativas en el sobrenadante de infecciones de células R-Rb (pases 90 y 100) con C-S8c1 y virus R (pases 5, 15, 60 y 70).** Las gráficas A y B representan las moléculas de RNA positivas y negativas en el sobrenadante de células RB-Rb 90 y 100, respectivamente, infectadas con C-S8c1 y virus R de la serie B. Las gráficas C y D representan las moléculas de RNA positivas y negativas en el sobrenadante de células RD-Rb 90 y 100, respectivamente, infectadas con C-S8c1 y virus R de la serie D. Las barras azules corresponden a las moléculas de RNA positivas/ μ l de sobrenadante. Las barras moradas corresponden a las moléculas de RNA negativas/ μ l de sobrenadante. Las determinaciones se hicieron por duplicado. Las figuras representan los valores medios.

Estos resultados sugieren que las células R han evolucionado, al igual que los virus R, adquiriendo la capacidad de mantener bajo el nivel de cadenas positivas, incluso inferior al de negativas. Por tanto, parece que tanto los virus como las células son responsables de que el nivel de cadenas negativas sea superior al de positivas, como resultado de la coevolución virus-célula que permite la persistencia del virus.

5.5.8.- Cuantificación de moléculas de RNA de polaridad positiva y negativa de virus R de los pases 45, 60 y 100 de la anterior infección persistente

Para comprobar si el hecho de que los virus R mantengan el nivel de moléculas de RNA de polaridad positiva tan bajo, incluso inferior a las de polaridad negativa, es una característica asociada a persistencia que aparece también en los virus R de la primera infección persistente establecida en nuestro laboratorio (de la Torre y cols. 1985), se determinó el número de moléculas de RNA positivas y negativas de los virus R (extracelulares e intracelulares) de los pases 45, 60 y 100 de dicha infección persistente (Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Determinación del número de moléculas de RNA positivas y negativas de virus R (pases 45, 60 y 100) de la primera infección persistente establecida en nuestro laboratorio.

A.

	Virus R45	Virus R60	Virus VR100
Moléculas ec RNA +	$1,2 \times 10^7$	$2,4 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^{10}$
Moléculas ec RNA -	$1,3 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$

B.

	Virus R45	Virus R60	Virus VR100
Moléculas ic RNA +	$3,2 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$
Moléculas ic RNA -	$2,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$

Las partes A y B de la tabla corresponden a la cuantificación de moléculas de RNA extra e intracelulares, respectivamente. Los valores representan las moléculas de RNA positivas y negativas correspondientes a 6×10^6 células R (placa p100 confluyente). Las determinaciones se hicieron por duplicado. Las tablas indican los valores medios. En todos los casos el número de moléculas obtenido está por encima del control negativo. La especificidad de las reacciones de amplificación se comprobó con el análisis de la curva de fusión del DNA amplificado en el Light Cycler y mediante electroforesis en gel de agarosa.

En todos los casos el nivel de moléculas de RNA positivas es superior al de negativas. En las dos series de líneas celulares persistentemente infectadas por C-S8c1 establecidas al comienzo de esta Tesis Doctoral se seleccionan variantes, tanto virales como celulares, que mantienen el nivel de RNA viral de cadena positiva bajo o inferior al de cadena negativa, como resultado de la coevolución virus-célula que permite la persistencia del virus. En cambio, esta característica no se observa, al menos en los pases 45, 60 y 100, en la primera infección persistente establecida en nuestro laboratorio. Por tanto, el aumento de proporción de RNA de polaridad negativa no sería una condición indispensable para mantener la persistencia del VFA en células BHK-21.

5.6.- Termosensibilidad de los virus R

Una de las características durante la persistencia del VFA en BHK-21, en la línea celular establecida inicialmente en nuestro laboratorio (de la Torre y cols. 1985), es el carácter termosensible de los virus R. Para analizar la termosensibilidad de los virus residentes en las nuevas líneas de persistencia, se infectaron células BHK-21 con C-S8c1 y virus R de las series B y D (pases 2, 20, 45 y 100) a 37° C y 42° C y se analizó la producción de moléculas de RNA por RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Figura 5.9.) y la infectividad por ensayos de plaqueo (Figura 5.10.).

Los virus R muestran una reducción de moléculas de RNA a 42° C de entre 2 y 5 logaritmos, mientras que con el virus C-S8c1, apenas se observa reducción (Figura 5.9.). En el caso de la infectividad (Figura 5.10.), se observa una reducción de UFPs/ml a 42° C de aproximadamente 3-5 logaritmos en los pases 2 y 20 a las 26 h.p.i., y pérdida total de infectividad en el pase 45 a 42° C. Sin embargo, en el control con C-S8c1 la infectividad se reduce aproximadamente un logaritmo. En el caso del pase 100 no se observa infectividad ni a 37° C ni a 42° C.

Se puede concluir que en las nuevas líneas de persistencia establecidas (series RB y RD) se repite el carácter termosensible de los virus R (de la Torre y cols. 1985).

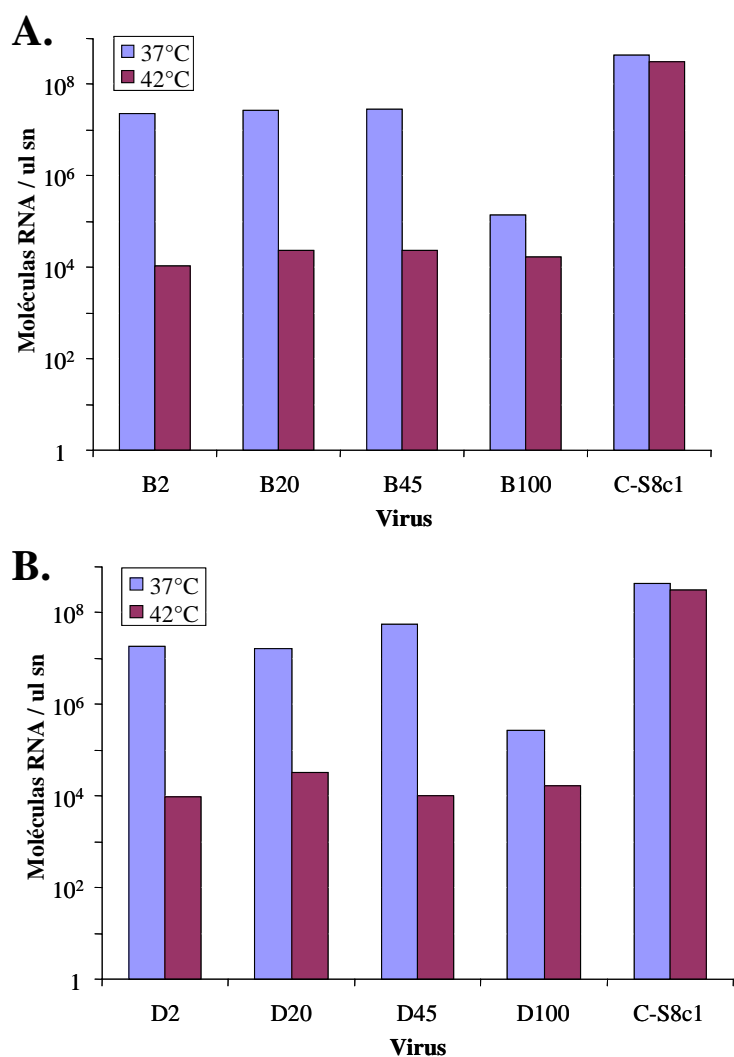
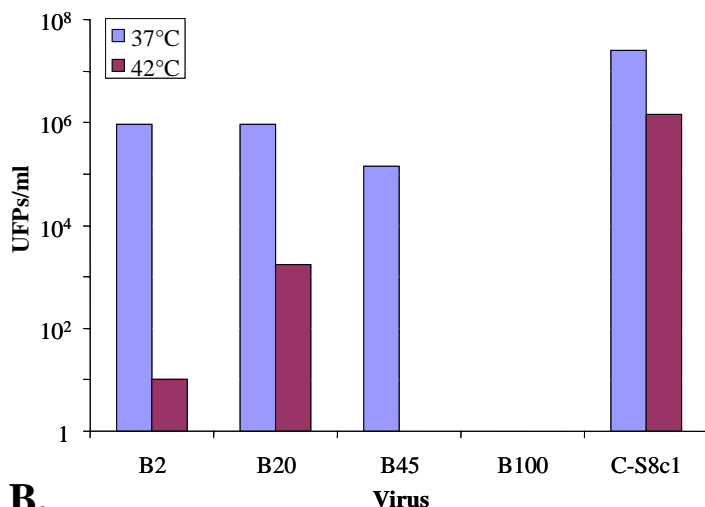


Figura 5.9. Moléculas de RNA extracelulares en infecciones de BHK-21 con virus R a 37°C y 42°C. La parte A muestra las moléculas de RNA extracelulares en la serie B a 26 h.p.i. La parte B muestra las moléculas de RNA extracelulares en la serie D a 26 h.p.i. Se analizaron también las moléculas de RNA a las 16 y 40 h.p.i. (resultados no mostrados) detectándose una reducción en la producción de RNA de los virus R a 42°C, respecto a la producción a 37°C, similar a la observada a las 26 h.p.i. Las barras azules y moradas corresponden a las moléculas de RNA/ μ l de sobrenadante a 37 y 42°C, respectivamente.

A.



B.

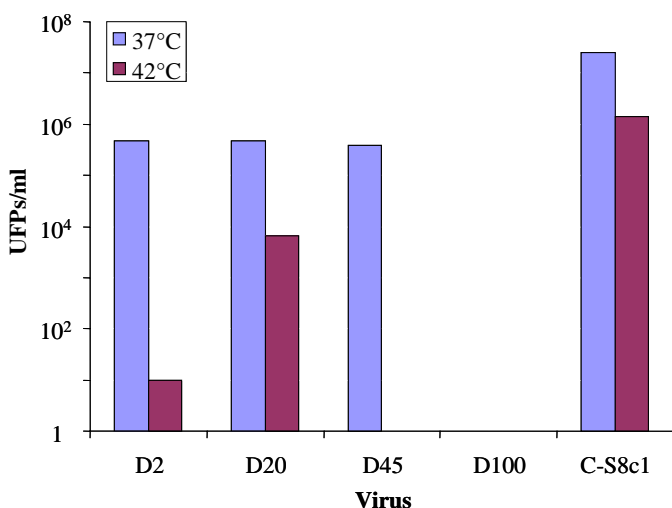


Figura 5.10. **Infectividad de virus R a 37°C y 42°C.** La parte A muestra las UFPs/ml en infecciones de BHK-21 con C-S8c1 y virus RB a 26 h.p.i. La parte B muestra las UFPs/ml en infecciones de BHK-21 con C-S8c1 y virus RD a 26 h.p.i. Se analizó también la infectividad a las 16 y 40 h.p.i. (resultados no mostrados) detectándose una reducción de infectividad de los virus R a 42°C, respecto a 37°C, similar a la observada a las 26 h.p.i. Las barras azules y moradas corresponden a las UFPs/ml de sobrenadante a 37 y 42°C, respectivamente. El límite de detección de la infectividad de las muestras fue de 7 UFPs/ml. En el caso de los virus B100 y D100 no se detecta infectividad ni a 37 ni a 42°C (Figura 5.4.).

5.7.- Virulencia de los virus R para células BHK-21

Se realizaron ensayos de virulencia, tal como se describe en Materiales y Métodos (sección 4.4.), para estudiar la evolución de la virulencia de los virus R durante la persistencia. Se infectaron células BHK-21 en pocillos de M96 (10⁴ células BHK-21c1/pocillo) con diluciones seriadas de los virus liberados en los medios de cultivo de los pases correspondientes de persistencia, se fijaron las placas a distintos tiempos postinfección con formaldehído al 2% y se tiñeron con cristal violeta (2% cristal violeta en formaldehído al 2%). El número de UFPs presente en cada pocillo permite

determinar el número de UFPs necesarios para lisar 10^4 células BHK-21 a distintos tiempos postinfección, que tomamos como medida de la virulencia para células BHK-21 (Introducción, sección 2.7.1.).

Como muestra la Figura 5.11., el número de UFPs necesario para lisar un número definido de células (10^4 células BHK-21) a un determinado tiempo postinfección disminuye a medida que avanzan los pases en las dos líneas de persistencia (B y D), siendo el virus menos virulento C-S8c1, seguido de Rp10 (virus R liberado en el pase 10), Rp20 (virus R liberado en el pase 20), y por último el virus Rp45 (virus R liberado en el pase 45), que resulta ser el más virulento de los empleados en el ensayo.

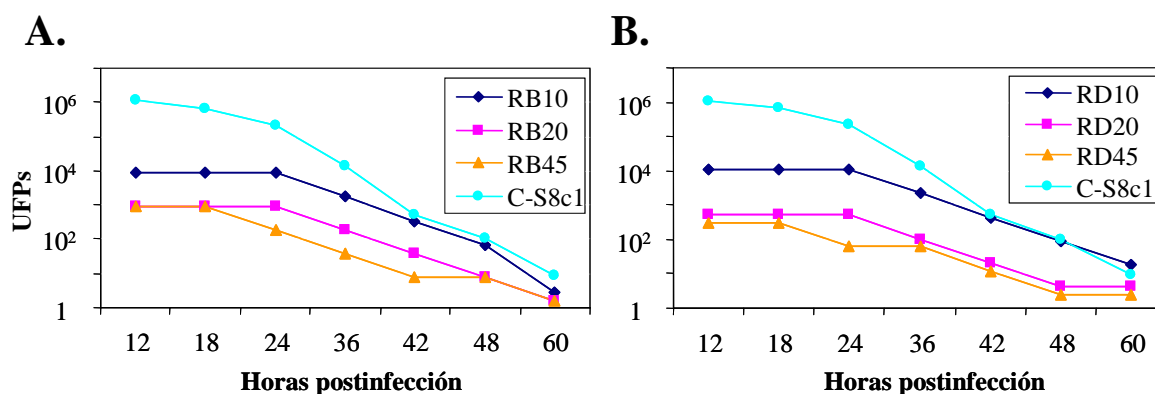


Figura 5.11. Variación del mínimo número de UFPs necesarias para lisar 10^4 células BHK-21 en función del tiempo. La parte A corresponde a la serie RB de persistencia, y la parte B a la serie RD. Las líneas azul claro, azul oscuro, rosa y naranja representan las UFPs de C-S8c1 y virus R de los pases 10, 20 y 45, respectivamente, necesarias para lisar 10^4 células BHK-21 en función del tiempo. Las determinaciones se realizaron por duplicado y las figuras representan los valores medios.

Esto nos permite concluir que, como se observó en trabajos previos empleando otra metodología (de la Torre y cols. 1985; Sáiz y Domingo 1996), la virulencia de los virus R para BHK-21 aumenta con el número de pase.

5.8.- Evolución de la capacidad replicativa (“fitness”) de virus R

Se ha determinado el “fitness” del virus residente de las células R del pase 100 de la primera infección persistente establecida en el laboratorio (virus VR100) con el objetivo de analizar la evolución de la capacidad replicativa durante la persistencia de C-S8c1 en células BHK-21 (Materiales y Métodos, sección 4.17.).

El virus VR100 presenta un “fitness” 3,4 veces superior respecto al del virus parental C-S8c1. Este ligero incremento de capacidad replicativa se corresponde con una reducción de la producción viral y las moléculas de RNA intracelulares y extracelulares, y con un gran incremento de virulencia en células BHK-21 (Introducción, sección 2.6.).

5.9.- Análisis de las secuencias de virus R

En trabajos anteriores, se secuenció el genoma del VR100 (virus liberado en el pase 100 de la primera línea de persistencia establecida) (Díez y cols. 1990; Toja y cols. 1999).

Se ha determinado la secuencia del virus extracelular liberado en el pase 45 de las nuevas líneas de persistencia (series B y D). La secuencia del VR100 mostraba 4 cambios de aminoácido en la región amino(N)- terminal de la proteína VP3 (Toja y cols. 1999). Como muestra la Tabla 5.6., 2 de estos cambios de aminoácido están presentes en la secuencia de RD 45 (D 9 A; N 13 H), y uno de ellos en la de RB 45 (D 9 A), lo que sugiere que al menos parte de los cambios genotípicos se repiten.

Tabla 5.6. Cambios de nucleótido y aminoácido en la secuencia de RB 45 y RD 45 respecto a C-S8c1 y VR100 (Toja y cols. 1999).

Nucleótido	Región genómica	Nucleótido (aa)			
		C-S8c1	VR100 ^a	RB 45 ^b	RD 45 ^b
365	Fragmento S	U		U	C
367		A		A	C
452	Pseudonudos	U		C	U
1118	L	G (G)		A (E)	A (E)
1411		U (C)		G (G)	G (G)
2576	VP3	A (D)	C (A)	C (A)	C (A)
2587		A (N)	C (H)	A (N)	C (H)
2767		C (L)		U (L)	U (L)
2997		U(G)		C (G)	C (G)
3653	VP1	C (T)		A (K)	A (K)
4026	2B	A (K)		G (K)	A (K)
4539	2C	U (D)		A (E)	A (E)
5465	3A	A (K)		G (G)	G (G)
7071	3D	A (E)		C (D)	C (D)
7305		A (Q)		G (Q)	G (Q)
7480		A (T)		A (T)	G (A)

^a La tabla representa únicamente los cambios de aminoácido de VR100 (Toja y cols. 1999) respecto a C-S8c1 que son comunes a RB 45 y RD 45.

^b En azul se señalan los cambios de nucleótido que implican cambio de aminoácido.

En los trabajos anteriores, para determinar la secuencia del virus persistente del pase 100, fue necesario amplificar el virus (de aproximadamente 10^3 UFPs a aproximadamente 10^8 UFPs) infectando BHK-21 citolíticamente, debido a la limitada producción de partículas infecciosas en los pases tardíos de persistencia.

En este trabajo se ha secuenciado el virus genoma completo del virus persistente del pase 45 (virus RB y RD) sin amplificar previamente por infección citolítica de BHK-21. Del total de 12 cambios de nucleótido presentes en el pase 45 de la serie B, 7 son transiciones y 5 transversiones, 5 son mutaciones silenciosas y 7 conducen a cambio de aminoácido (Tabla 5.7.). En el caso de RD 45, aparecen 14 cambios de nucleótido,

de los cuales 7 son transiciones y 7 transversiones, 5 son mutaciones silenciosas y 9 conducen a cambio de aminoácido. Las frecuencias de mutación de RB 45 y RD 45, calculadas respecto a C-S8c1, son $1,5 \times 10^{-3}$ sustituciones/nucleótido y $1,7 \times 10^{-3}$ sustituciones/nucleótido, respectivamente.

Tabla 5.7. Análisis de mutaciones de RB 45 y RD 45.

Virus	Mutaciones ^a	Transiciones	Transversiones	Mutaciones sinónimas	Mutaciones no sinónimas
RB 45	12	7	5	5	7
RD 45	14	7	7	5	9
	10 comunes	5 comunes	5 comunes	3 comunes	7 comunes

^a Las mutaciones se miden respecto a la secuencia de C-S8c1.

La evolución en las dos series de persistencia (RB y RD) es muy paralela, no sólo a nivel fenotípico, sino también a nivel genético. La mayoría de las mutaciones que implican cambio de aminoácido aparecen en ambas series, siendo algunas comunes a la primera infección persistente establecida en el laboratorio.

Se intentó secuenciar también el virus persistente del pase 100 (virus RB100 y RD100). Se llevaron a cabo varios abordajes para obtener la secuencia completa del virus R100, pero debido a la cantidad limitante de RNA en dicho pase todos los intentos dieron resultados negativos. Las únicas regiones que pudieron amplificarse mediante RT-PCR son las que se detallan en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8. Cambios de nucleótido y aminoácido en la secuencia de RB 100 y RD 100 respecto a C-S8c1 y VR100 (Toja y cols. 1999).

Nucleótido	Región genómica	Nucleótido (aa)			
		C-S8c1	VR100 ^a	RB 100 ^b	RD 100 ^b
2431-2433	VP 2	CUC (L)		CUC (L)	GUG (V)
2477		C (A)		C (A)	U (V)
2517		C (N)		C (N)	A (K)
2576	VP3	A (D)	C (A)	C (A)	C (A)
2587		A (N)	C (H)	C (H)	C (H)
7595	3D	A (D)		G (G)	A (D)
7324		G (V)		G (V)	A (M)
7358		G (S)		G (S)	U (I)
7458		C (H)		C (H)	U (H)

^a La tabla representa únicamente los cambios de aminoácido de VR100 (Toja y cols. 1999) respecto a C-S8c1 que son comunes a RB 100 y RD 100.

^b En azul se señalan los cambios de nucleótido que implican cambio de aminoácido.

5.10.- Curación de células R con ribavirina (Rb) y por dilución

En el estudio de infecciones persistentes, la posibilidad de obtener células R curadas mediante tratamiento con Rb (Introducción, sección 2.6.1.) nos permite comparar las propiedades de las mismas células hospedadoras en presencia y ausencia del virus. La comparación de varios tratamientos sugiere que tanto el desequilibrio de las reservas (“pools”) de nucleótidos como la mutagénesis directa contribuyen al efecto antiviral de la Rb en infecciones persistentes de VFA en células en cultivo (Airaksinen y cols. 2003).

Las células RB y RD del pase 90 y 100 se trataron durante tres días con Rb (Materiales y Métodos, sección 4.15.) a una concentración de 150 µg/ml, seguido de tres pases de las células en ausencia de la droga (de la Torre y cols. 1987). Se comprobó que, tras el tratamiento con Rb, no se detectaba ni infectividad mediante ensayos de plaqueo ni presencia de RNA mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Light Cycler).

Tal como se describe en (de la Torre y Domingo 1988) también es posible curar las células R por dilución. Se determinó el mínimo número de células que, a partir de un cultivo persistentemente infectado, se necesitan para reconstruir el sistema portador. En el caso de las células R persistentemente infectadas se necesitan más de 10^3 células derivadas de una monocapa para reiniciar un cultivo portador estable. Por tanto, la persistencia es resultado de complejas interacciones a nivel poblacional.

De acuerdo con dichos resultados (de la Torre y Domingo 1988), se han curado por dilución células RB y RD de los pases 2, 15, 30 y 45, seleccionando 10^2 células derivadas de una monocapa persistentemente infectada, y se ha comprobado que no se detecta infectividad ni producción de RNA.

Se observa que a pesar de no tener virus detectable, las células curadas en pases tardíos de persistencia difieren considerablemente de las células parentales BHK-21: muestran una morfología más redondeada, mayor grado de transformación, y considerable resistencia a C-S8c1 (de la Torre y cols. 1988).

5.11.- Resistencia a infección con C-S8c1 y MARLS de células R curadas con ribavirina

Anteriormente se había descrito que células R curadas en pases tempranos de persistencia (por ejemplo, pase 20) muestran e.c.p. y producen virus de forma similar a BHK-21 al ser infectadas por VFA C-S8c1, aunque la frecuencia de células supervivientes a la infección es unas 10-100 veces superior a la obtenida en infecciones de BHK-21. En cambio, células R curadas en pases tardíos de persistencia (por ejemplo, pase 50) no muestran e.c.p., pero sí producción viral, aunque unas 100 veces inferior a la producción por BHK-21 (de la Torre y cols. 1988).

Con el objetivo de analizar la resistencia a la infección por VFA de las células RB y RD curadas, se infectaron tanto células BHK-21 como células RB y RD de los pases 90 y 100 curadas con ribavirina (R90 Rb y R100 Rb) con C-S8c1 y MARLS.

La Tabla 5.9. muestra las horas postinfección en las que se observa un efecto citopático completo en la monocapa de células. Las células R curadas no muestran e.c.p. al ser infectadas con C-S8c1, pero sí lo hacen al ser infectadas con un virus más

virulento como MARLS, aunque el e.c.p. aparece con retraso respecto a BHK-21 infectadas con el mismo virus.

Tabla 5.9. Horas postinfección en las que se observa un e.c.p. completo en la monocapa de células.

	BHK-21	R 90-Rb		R 100-Rb	
		Serie RB	Serie RD	Serie RB	Serie RD
C-S8c1	24 hpi	no e.c.p. ^a	no e.c.p. ^a	no e.c.p. ^a	no e.c.p. ^a
MARLS	20 hpi	48 hpi	48 hpi	48 hpi	48 hpi

^a En el caso de C-S8c1 no se observó e.c.p. tras infectar células R curadas con ribavirina.

La Tabla 5.10. muestra las moléculas de RNA/μl de sobrenadante de células infectadas con C-S8c1 y MARLS a las 24 horas postinfección. Las células R curadas presentan una producción de RNA viral unas 100 veces inferior a la producción en BHK-21 tras ser infectadas con C-S8c1. En el caso de MARLS la reducción en la producción de RNA viral es de 10 veces.

Tabla 5.10. Moléculas de RNA/μl de sn de células infectadas con C-S8 y MARLS a las 24 horas postinfección.

	BHK-21	R 90-Rb		R 100-Rb	
		Serie RB	Serie RD	Serie RB	Serie RD
C-S8c1	$4,1 \times 10^7$	$7,2 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$3,3 \times 10^6$
MARLS	$1,6 \times 10^9$	$2,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$

Las determinaciones se hicieron por duplicado en todos los casos. La tabla indica los valores medios.

Por tanto, los resultados obtenidos coinciden con los observados en la infección persistente establecida anteriormente en el laboratorio (de la Tore y cols. 1985, 1988). Las células R curadas en diferentes pases durante la persistencia presentan un comportamiento biológico, en cuanto a su susceptibilidad a VFA, diferente de las BHK-21. Las células R curadas en pases tempranos muestran un comportamiento más

parecido al de BHK-21 que aquellas que se curan en pases más tardíos. Los resultados sugieren que se seleccionan variantes celulares durante la persistencia y que la selección está influida por el estado de persistencia.

5.12.- Ausencia de componentes en el medio de cultivo de células R100 que interfieren con la infección de células BHK-21 por C-S8c1

Para comprobar si el medio de cultivo en el que se han multiplicado las células R100 interfiere con la infección de células BHK-21 por C-S8c1, se sembraron distintas cantidades de células BHK-21 en pocillos de una placa M24, para que alcanzaran la confluencia óptima para ser infectadas con C-S8c1 a las 24, 48 y 72 horas post-siembra. Las células se incubaron con medio DMEM o con una mezcla de medio DMEM y medio en el que se habían cultivado células R100, de forma que el tiempo de incubación de las células antes de ser infectadas fue de 24, 48 ó 72 horas. Tras la infección con C-S8c1 se determinó la infectividad de los sobrenadantes mediante ensayos de plaqueo en medio de agar semisólido.

Como muestra la Tabla 5.11. no se observan diferencias entre el título viral de las muestras de células BHK-21 infectadas con C-S8c1 incubadas con medio DMEM con o sin medio de cultivo de células R100 añadido. Esta ausencia de interferencia ya fue descrita en trabajos anteriores del laboratorio (de la Torre y cols. 1985). Por tanto la resistencia de las células R a la infección con VFA está mediada principalmente por componentes intracelulares que no son liberados al medio de cultivo (de la Torre y cols. 1989a).

Tabla 5.11. Título viral de sobrenadantes de infección de células BHK-21 infectadas con C-S8c1 tras 24, 48 ó 72 horas de incubación con medio DMEM o una mezcla de medio DMEM con medio de cultivo de células R100.

Medio de incubación	Tiempo de incubación (pre-infección)		
	24 horas	48 horas	72 horas
DMEM	$7,3 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$
DMEM + medio de cultivo de células R100	$7,3 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$7,0 \times 10^7$

La tabla representa las UFPs/ml de los sobrenadantes de infección. Las determinaciones del título viral se hicieron por duplicado y la tabla indica representa los valores medios.

5.13.- Determinación de los niveles de NTPs de las células R

Se analizaron mediante HPLC las concentraciones intracelulares de UTP, ATP, CTP y GTP en extractos de células BHK-21 y células R de los pases 15, 30, 35 y 50 de persistencia.

Como muestran las Figuras 5.12. A y B los niveles de NTPs en células R son muy similares a los presentes en células BHK-21. Se observa una ligera reducción en los niveles de NTPs a medida que aumenta el número de pase, principalmente de ATP y UTP, pero no son diferencias significativas.

Anteriormente en nuestro laboratorio, el Dr. Antero Airaksinen analizó mediante HPLC los niveles intracelulares de NTPs en células R de la primera infección persistente establecida en el laboratorio (de la Torre y cols. 1985, 1988), y comprobó que los niveles se reducían aproximadamente el 50% respecto a los niveles en BHK-21 (Figura 5.12. C).

En las dos nuevas líneas de persistencia (series RB y RD) los niveles de NTPs de las células R de los pases 5, 30, 35 y 50 no se reducen a la mitad de los de células BHK-21 en ningún caso, por lo que, según estos resultados, alteraciones significativas de los niveles de NTPs intracelulares no parecen ser un factor determinante en el mantenimiento de la persistencia.

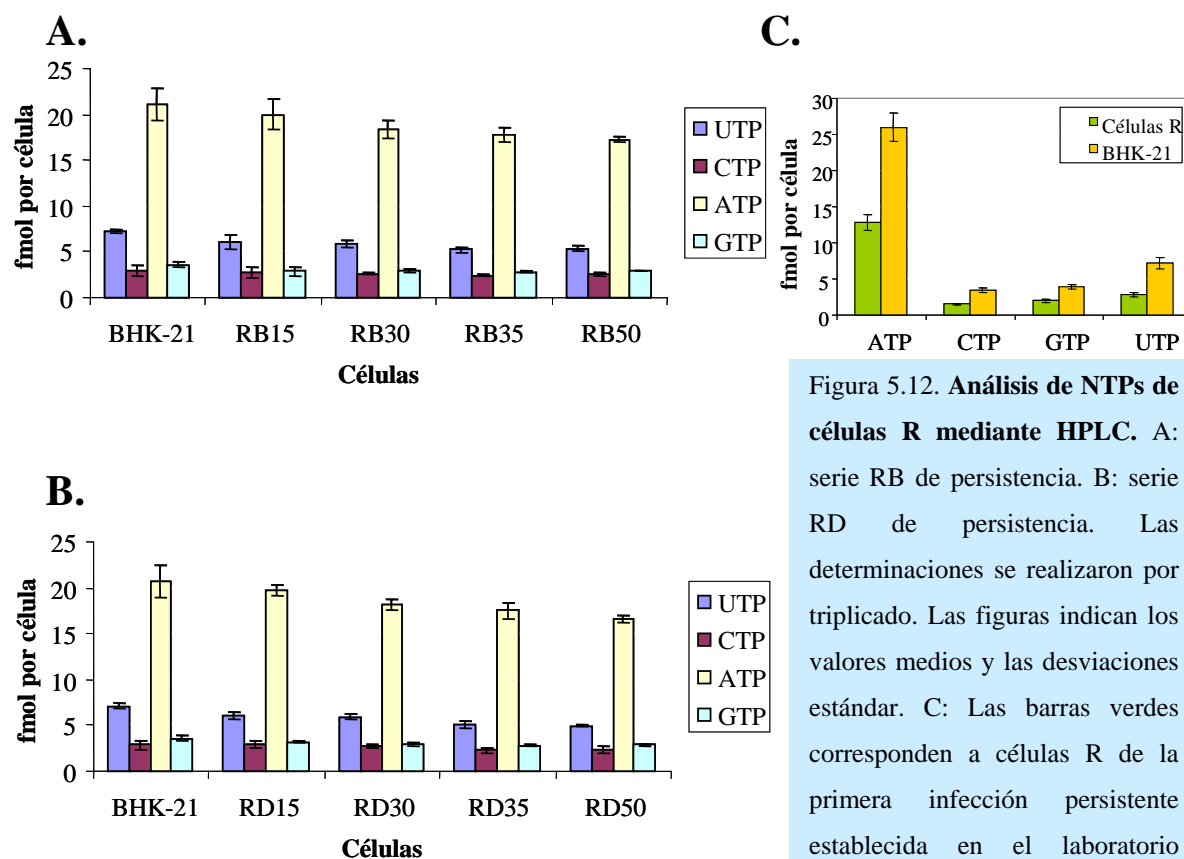


Figura 5.12. Análisis de NTPs de células R mediante HPLC. A: serie RB de persistencia. B: serie RD de persistencia. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Las figuras indican los valores medios y las desviaciones estándar. C: Las barras verdes corresponden a células R de la primera infección persistente establecida en el laboratorio (Airaksinen, y cols. 2003).

Las barras naranjas corresponden a células BHK-21. Las determinaciones se hicieron por triplicado. La figura representa los valores medios y las desviaciones estándar.

5.14.- Intentos de establecimiento de persistencia por un virus de baja eficacia biológica

Anteriormente en nuestro laboratorio se había observado que un virus de alta eficacia biológica y alta virulencia como MARLS (Charpentier y cols. 1996) era incapaz de establecer persistencia en cultivos celulares (Airaksinen, resultados no publicados). Para comprobar si un virus de bajo “fitness” pudiera establecer una infección persistente con facilidad debido a su menor capacidad replicativa, se eligió el virus H⁵₉₅ (Escarmís y cols. 1996, 2002), cuyo valor de eficacia biológica relativa es de 0,11 respecto a C-S8c1, al que se adjudica un valor de “fitness” de 1 (Materiales y Métodos, sección 4.2.1.).

Para ello, se infectó una monocapa confluyente de BHK-21 con H⁵₉₅ a una m.o.i de 0,1-0,02 UFPs/cel. A las 24 h.p.i. se observó e.c.p. y a las 48 h.p.i. en lugar de encontrar un índice de supervivencia celular superior al hallado con C-S8c1, no se halló ninguna célula superviviente (índice de supervivencia $< 4 \times 10^{-4}$). En infecciones en paralelo con C-S8c1, la frecuencia de células supervivientes fue de 5×10^{-3} - 9×10^{-3} , como se observó también en el establecimiento de las líneas celulares persistentemente infectadas por C-S8c1 (sección 5.1; de la Torre y cols. 1985). Por tanto, H⁵₉₅ es incapaz de establecer persistencia en BHK-21, mostrando mayor virulencia que C-S8c1, o lo que es lo mismo, C-S8c1, que posee un “fitness” relativo 9 veces superior a H⁵₉₅ en células BHK-21, muestra una capacidad de matar células 10^3 veces inferior.

La alta virulencia de H⁵₉₅ para células BHK-21 resultó inesperada ya que en el curso de los pases placa a placa en células BHK-21, domina la deriva genética, las mutaciones se acumulan linealmente, y el “fitness” viral disminuye siguiendo un patrón bifásico y fluctuante (Chao 1990; Escarmís y cols. 1996; Lázaro y cols. 2002, 2003; revisado en Escarmís y cols. 2006).

Este resultado sugiere que, al menos en algunos sistemas biológicos, la virulencia puede ser independiente del “fitness” viral, es decir, que un virus de menor eficacia biológica no tiene que ser necesariamente menos virulento que uno de mayor “fitness”. Dadas las implicaciones de esta observación, se diseñaron experimentos adicionales a fin de cuantificar de modo más preciso la relación entre “fitness” y virulencia.

5.15.- Ausencia de correlación entre “fitness” y capacidad de matar células BHK-21

Debemos reiterar que en los experimentos que nos ocupan, definimos virulencia como el mínimo número de UFPs necesario para matar un número definido de células BHK-21 (10^4 células, que es la cantidad de células que completan una monocapa correspondiente a un pocillo de una placa M96) en un tiempo determinado. Definimos eficacia biológica o “fitness” como la capacidad replicativa relativa del virus en las células BHK-21 (Holland y cols. 1991; Domingo y Holland 1997; Domingo y cols. 2003). En nuestro caso se emplea C-S8c1 como virus de referencia, al que se adjudica un valor de “fitness” igual a 1 (Introducción, sección 2.1.3.). Es decir, tanto “fitness” como virulencia se definen en nuestro sistema en el mismo ambiente biológico representado por las células BHK-21.

Para tratar de esclarecer la relación entre “fitness” y virulencia se realizaron ensayos de virulencia con clones o poblaciones de VFA de distinta eficacia biológica (Tabla 5.12.), tal como se explica en Materiales y Métodos (sección 4.4).

En todos los casos el número de UFPs necesarios para matar 10^4 células BHK-21 varió logarítmicamente en función del tiempo (Figura 5.13.). El número de UFPs de H^{5}_{95} necesarias para matar 10^4 células fue menor que para C-S8c1 (Figura 5.13.A). Por ejemplo, a las 24 horas postinfección, C-S8c1 requirió del orden de 10 veces más UFPs que H^{5}_{95} para matar 10^4 células. MARLS y C-S8p260p3d, los virus más virulentos de los incluidos en el ensayo, presentaron una virulencia bastante similar hasta las 42 horas postinfección y prácticamente idéntica a tiempos postinfección más tardíos. Los resultados indican que, entre las 12 y 24 h.p.i., la virulencia de H^{5}_{95} es entre 30 y 40 veces superior a la de C-S8c1, a pesar de que éste presenta un valor de “fitness” sólo 9 veces superior (Tabla 5.12.). H^{5}_{95} (un virus de bajo “fitness”; Pariente y cols. 2003) muestra una virulencia intermedia entre C-S8c1 (un virus de “fitness” intermedio) y MARLS y CS8p20p3d (ambos virus de alto “fitness”; García-Arriaza y cols. 2005).

La alta virulencia de H^{5}_{95} no es debida a los pases placa a placa, ya que tanto su clon parental (H^{5}_{0}) como la población C-S8c1p113, de la cual procede dicho clon, muestran también una alta virulencia (Figura 5.13.B. y Tabla 5.12.). H^{5}_{95} se desvía de la línea que correlaciona “fitness” relativo y virulencia relativa de VFA (inserto en Figura 5.13.A.).

Excepto H_{95}^5 , el resto de VFA empleados en el ensayo muestran una correlación razonable entre “fitness” relativo y virulencia (capacidad de matar células BHK-21). Sin embargo, la elevada virulencia de H_{95}^5 respecto a C-S8c1 (30-40 veces superior) a pesar de su bajo “fitness”, indica que virulencia y “fitness” viral pueden ser dos características independientes. Esta observación tiene implicaciones para entender la relación parásito-hospedador y virulencia en otros sistemas biológicos, tal como se describe en la Discusión (sección 6.6.).

Tabla 5.12. “Fitness” relativo y virulencia relativa de clones y poblaciones de VFA.

Virus ^a	“Fitness” relativo ^b	Virulencia relativa ^c
C-S8c1	1	1
H_0^5	26	104
H_{95}^5	0,11	35
MARLS	25	3917
CS8p260p3d	20	1284

^a El origen de los VFAs empleados se describe en Materiales y Métodos (sección 4.2.1.).

^b Los valores de “fitness” han sido determinados tal como se describe en Materiales y Métodos (sección 4.17.), y son relativos a C-S8c1, al que se adjudica un valor de “fitness” de 1.

^c La virulencia para células BHK-21 ha sido determinada mediante ensayos de virulencia, descritos en Materiales y Métodos (sección 4.4.). Los valores de virulencia relativa se representan como el mínimo número de UFPs necesarias para matar 10^4 células en 24 horas, normalizados con el número de UFPs requeridas por C-S8c1.

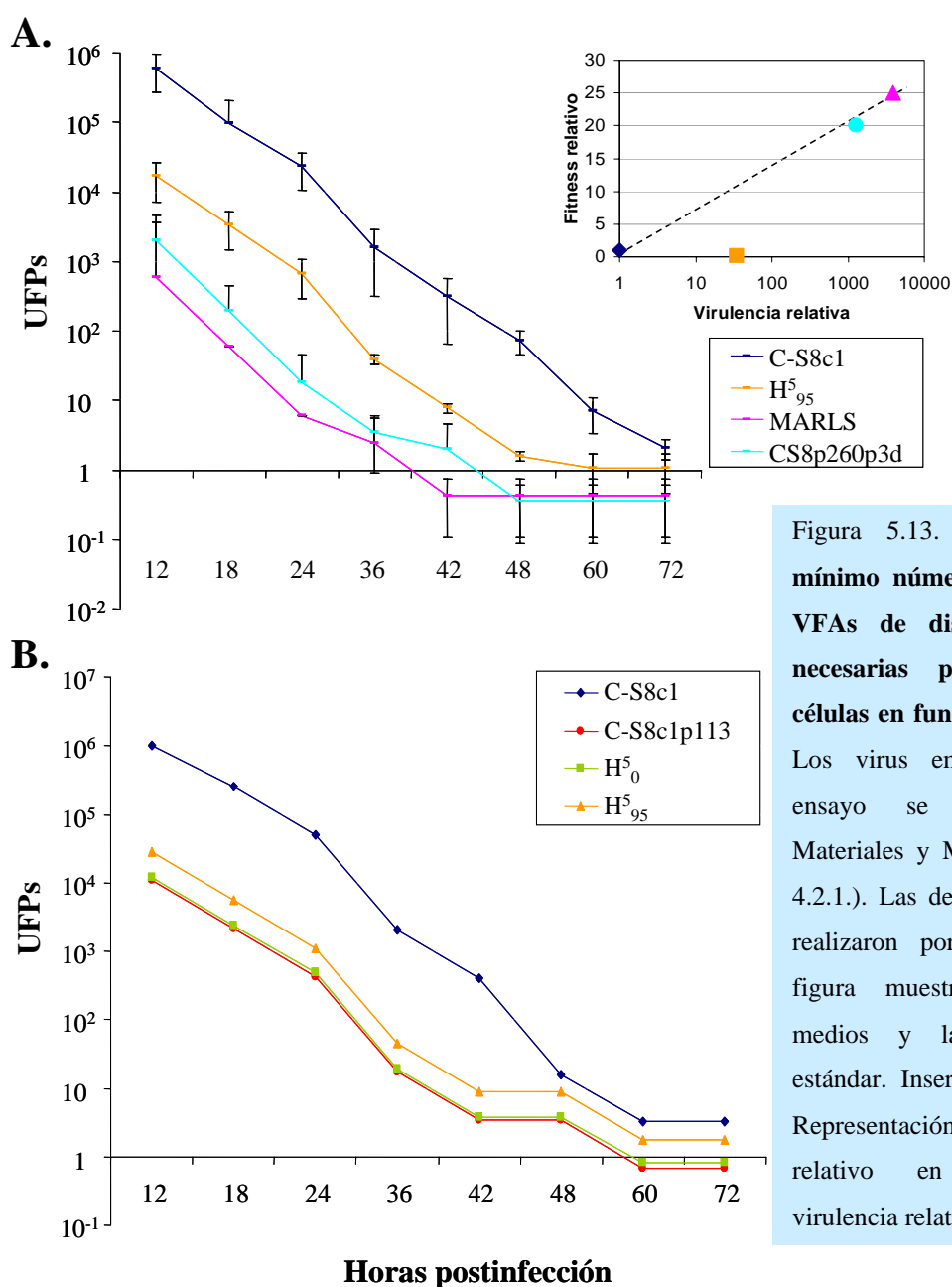


Figura 5.13. Variación del mínimo número de UFPs de VFAs de distinto "fitness" necesarias para lisar 10^4 células en función del tiempo. Los virus empleados en el ensayo se describen en Materiales y Métodos (sección 4.2.1.). Las determinaciones se realizaron por triplicado. La figura muestra los valores medios y las desviaciones estándar. Inserto en Figura A: Representación de "fitness" relativo en función de virulencia relativa de VFAs.

5.16.- Mapeo de determinantes de virulencia en H^5_{95}

5.16.1.- Determinación de la secuencia del genoma de H^5_{95}

Como primer paso para tratar de identificar regiones genómicas o mutaciones específicas como determinantes de virulencia, se determinó la secuencia de nucleótidos del genoma de H^5_{95} y se comparó con la del virus parental C-S8c1 (Tabla 5.13.). Se extrajo el RNA viral de H^5_{95} y se amplificó el genoma por RT-PCR (Materiales y

Métodos, sección 4.8.) utilizando diferentes parejas de iniciadores que abarcaron todo el genoma de H⁵₉₅ excepto el poliC interno y el tramo de poliA 3' terminal.

Tabla 5.13. Mutaciones encontradas en el genoma del virus H⁵₉₅ respecto a la secuencia de C-S8c1.

Región genómica ^a	Mutaciones ^b	Cambio de aa ^c	Clones serie H ^d
Fragmento S	C-32-A	-	H ⁵ ₈₀
	C-64-U	-	H ⁵ ₁
	C-247-U	-	H ⁵ ₁
Pseudonudos	G-476-A	-	H ⁵ ₁
	A-492-G	-	H ⁵ ₈₀
	G-504-U	-	H ⁵ ₈₀
IRES	C-509-U	-	H ⁵ ₈₀
	A-809-G	-	H ⁵ ₉₅
	U-856-C	-	H ⁵ ₁
VP4	U-1742-C	M 34 T *	H ⁵ ₈₀
	A-1851-G	-	H ⁵ ₃₀
VP3	C-2624-U	A 25 V	H ⁵ ₁
	U-2710-C	F 54 L	H ⁵ ₈₀
	G-3067-A	E 173 K	H ⁵ ₁
	C-3120-U	-	H ⁵ ₈₀
	C-3202-A	Q 218 K	H ⁵ ₁
VP1	A-3328-G	K 41 E	H ⁵ ₁
	G-3342-A	-	H ⁵ ₃₀
	U-3345-A	D 46 E	H ⁵ ₁
	C-3617-U	T 137 I	H ⁵ ₉₅
	U-3660-C	-	H ⁵ ₃₀
	A-3719-G	E 171 G	H ⁵ ₁
	A-3797-G	H 197 R	H ⁵ ₁
2A	A-3842-G	D 3 G	H ⁵ ₃₀
	U-3864-C	-	H ⁵ ₈₀
2B	C-3891-U	-	H ⁵ ₈₀
	A-3933-G	-	H ⁵ ₈₀
	C-3984-A	N 34 K	H ⁵ ₈₀
	A-4072-G	I 64 V *	H ⁵ ₈₀

Región genómica ^a	Mutaciones ^b	Cambio de aa ^c	Clones serie H ^d
2B	G-4105-A	A 75 T *	H ⁵ ₈₀
2C	G-4583-A	S 80 N	H ⁵ ₁
	U-4812-C	-	H ⁵ ₉₅
	U-5077-C	-	H ⁵ ₈₀
	A-5110-G	T 256 A	H ⁵ ₁
	G-5133-C	Q 263 H	H ⁵ ₁
3A	U-5454-C	-	H ⁵ ₁
	A-5546-G	Q 83 R	H ⁵ ₁
	A-5590-G	N 98 D	H ⁵ ₃₀
	A-5599-G	T 101 A	H ⁵ ₈₀
3C	U-6306-C	-	H ⁵ ₁
3D	U-6702-C	-	H ⁵ ₉₅
	U-6724-C	-	H ⁵ ₈₀
	A-6753-G	-	H ⁵ ₈₀
	U-6789-C	-	H ⁵ ₈₀
	G-7467-U	E 286 D	H ⁵ ₈₀
	G-7554-U	-	H ⁵ ₁
3' UTR	G-8042-C	-	H ⁵ ₃₀

^a Las distintas zonas del genoma de VFA se detallan en Introducción (Figura 2.3.).

^b La primera letra corresponde al nucleótido encontrado en el virus parental C-S8c1; el número indica la posición de dicho nucleótido en el genoma de C-S8c1.

^c Se usa el código de una letra para los aminoácidos (descrito en Abreviaturas); el primer aminoácido es el presente en C-S8c1 y el número indica la posición de dicho aminoácido; -, indica una mutación silenciosa; *, indica que es una posición conservada en VFA según Carrillo y cols. (2005).

^d Clon de la serie H en el que aparece por primera vez la mutación (Escarmís y cols. 1996, 2002).

La frecuencia de mutación de H⁵₉₅ y el porcentaje de transiciones, transversiones y mutaciones no sinónimas, respecto a C-S8c1, es muy similar al de otros clones de pases placa a placa (Escarmís y cols. 1996, 2002) (Tabla 5.14. A).

H⁵₉₅ difiere de C-S8c1 en 47 mutaciones, de las cuales 18 (38,3% del total) están presentes en la secuencia de H⁵₁, es decir que se fijaron como consecuencia de los 113 pases en células BHK-21 a alta m.d.i. (esquema de pases en Introducción, Figura 2.5.);

29 mutaciones adicionales (61,7% del total) se fijaron en el transcurso de los pases placa a placa (6 de estas 29 mutaciones están presentes en la secuencia del clon H⁵₃₀ (Escarmís y cols. 1996), 19 mutaciones adicionales están presentes en la secuencia del clon H⁵₈₀ (Escarmís y cols. 2002) y 4 mutaciones adicionales están presentes en la secuencia del clon H⁵₉₅) (Tabla 5.14. B). Estas mutaciones conducen a 21 sustituciones de aminoácido que afectan tanto a las proteínas estructurales como a las no estructurales (Figura 5.14.).

Las mutaciones presentes en el genoma de H⁵₉₅ se mantienen en los clones de pases placa a placa posteriores (no hay reversiones) (Escarmís y cols. 2002).

Tabla 5.14. Análisis de mutaciones de H⁵₉₅.

A.

Clon VFA	Frecuencia de mutación ^a	Transiciones %	Transversiones %	Mutaciones no sinónimas %
H ⁵ ₉₅	$5,8 \times 10^{-3}$	80,8	19,1	44,7

B.

Clon VFA	Nº total de mutaciones	Mutaciones consecuencia de pases a alta m.d.i. ^b	Mutaciones consecuencia de pases placa a placa		
			30 pases ^c	80 pases ^d	95 pases ^e
H ⁵ ₉₅	47	18	6	19	4

^a La frecuencia de mutación se calculó dividiendo el número de mutaciones encontradas en el clon por el número total de nucleótidos secuenciados (8115 nucleótidos).

^b Mutaciones presentes en la secuencia del clon H⁵₁, que aparecen como consecuencia de 113 pases a alta m.d.i. en células BHK-21 del virus H (C-S8c1p113) (ver esquema de pases en Introducción, Figura 2.5.).

^c Mutaciones presentes en la secuencia del clon H⁵₃₀, que se fijaron en el transcurso de 30 pases placa a placa del virus H (Escarmís y cols. 1996).

^d Mutaciones presentes en la secuencia del clon H⁵₈₀, que se fijaron en el transcurso de 50 pases adicionales placa a placa del virus H (Escarmís y cols. 2002).

^e Mutaciones presentes en la secuencia del clon H⁵₉₅, que se fijaron en el transcurso de 15 pases adicionales placa a placa del virus H.

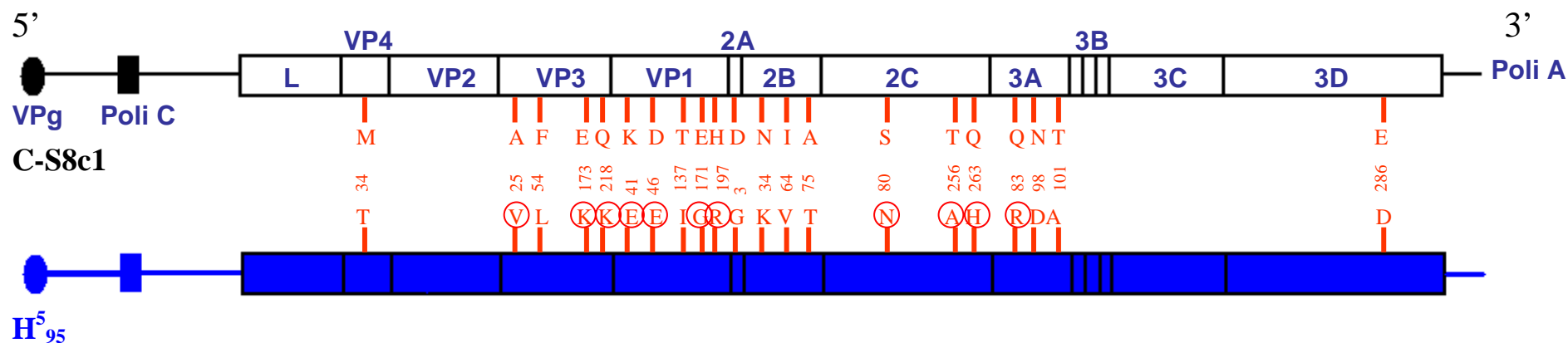


Figura 5.14. **Cambios de aminoácido en el genoma de H⁵₉₅ respecto al de C-S8c1.** En el esquema las zonas 5' y 3' no codificantes se indican con rayas horizontales y las zonas codificantes mediante rectángulos con el nombre de las proteínas codificadas. La proteína VPg y el tramo de poli C se representan como un círculo y un rectángulo, respectivamente, en la zona 5' no codificante. Los genomas de C-S8c1 y H⁵₉₅ están representados en blanco y azul, respectivamente. Los cambios de aminoácido se indican en rojo, y las sustituciones presentes en el genoma del clon H⁵₁ se representan en el interior de un círculo. La numeración de los residuos del VFA es la descrita en Toja y cols. (1999).

5.16.2.- Identificación de mutaciones implicadas en virulencia de H^{5}_{95}

Estudios previos con poblaciones naturales y de laboratorio de VFA han definido al menos tres determinantes de virulencia en cultivos celulares o en animales: la cápsida viral, la proteína no estructural 3A y el IRES (Introducción, sección 2.7.2.).

Estudios previos con rinovirus humano han relacionado cambios de aminoácido en las proteínas no estructurales 2C (Harris y Racaniello 2003), 2B y 3A (Harris y Racaniello 2005) con un aumento de virulencia en células de ratón.

Teniendo en cuenta estos datos, se realizó un estudio sobre el origen de las mutaciones presentes en cada una de estas regiones del genoma de H^{5}_{95} (Tabla 5.15.).

Tabla 5.15. Origen de mutaciones en el genoma de H^{5}_{95} respecto a C-S8c1.

Región genómica	Mutaciones consecuencia de pases a alta m.d.i. ^c	Mutaciones consecuencia de pases placa a placa ^c
IRES	U-856-C	A-809-G
Cápsida viral ^{a b}	G-3067-A (E 173 K)	
	C-3202-A (Q 218 K)	
	A-3719-G (E 171 G)	
Proteína 2B ^b		C-3984-A (N 34 K)
		A-4072-G (I 64 V) *
		G-4105-A (A 75 T) *
Proteína 2C ^b	G-4583-A (S 80 N)	
	A-5110-G (T 256 A)	
	G-5133-C (Q 263 H)	
Proteína 3A ^b	A-5546-G (Q 83 R)	A-5590-G (N 98 D)
		A-5599-G (T 101 A)

^a Se indican únicamente las mutaciones que aumentan la carga positiva en la cápsida.

^b Se indican únicamente las mutaciones no sinónimas.

^c La primera letra corresponde al nucleótido encontrado en el virus parental C-S8c1; el número indica la posición de dicho nucleótido en el genoma de C-S8c1; entre paréntesis se indica el cambio de aminoácido. Se usa el código de una letra para los aminoácidos (descrito en Abreviaturas). El primer aminoácido es el presente en C-S8c1 y el número indica la posición de dicho aminoácido; *, indica que es una posición conservada en VFA según Carrillo y cols. (2005). Todas las mutaciones que se incorporaron al genoma durante los pases a alta m.d.i. se mantuvieron durante los pases placa a placa.

Los tres cambios de aminoácido que aumentan la carga positiva en la cápsida aparecen como consecuencia de los pases a alta m.d.i. Dos de estos tres cambios de aminoácido aparecen en C-S8p50 y se mantienen en todas las poblaciones hasta el pase 460. Los pases a alta m.d.i. de VFA en células BHK-21 también conducen a la aparición de un elevado número de mutaciones en la proteína 2C. Los tres cambios de aminoácido en dicha proteína en el genoma de H^{5}_{95} están presentes en C-S8p113 y se mantienen en todas las poblaciones hasta el pase 460 (García-Arriaza y cols. resultados no publicados) (ver esquema de pases en Introducción, Figura 2.5.).

La presencia (previa a los pases placa a placa) de estas mutaciones, como consecuencia de pases a alta m.d.i., y su mantenimiento durante los pases placa a placa, puede explicar la elevada virulencia mostrada por un virus de bajo “fitness” (Discusión, sección 6.5.1.).

5.16.3.- Virulencia de virus quiméricos H^{5}_{95} /C-S8c1

Para identificar las regiones del genoma asociadas a la alta virulencia de H^{5}_{95} , se realizaron ensayos de virulencia para determinar la capacidad de matar células BHK-21 de virus quiméricos (Materiales y Métodos, sección 4.2.2) rescatados de transcritos de plásmidos obtenidos introduciendo fragmentos de cDNA del genoma de H^{5}_{95} en el plásmido pMT28 (Figura 5.15.), tal como se describe en Materiales y Métodos (sección 4.11.2.). El plásmido pMT28 es un clon infeccioso de C-S8c1 derivado del pMT15 (Toja 1997), descrito en Materiales y Métodos (sección 4.10.1.).

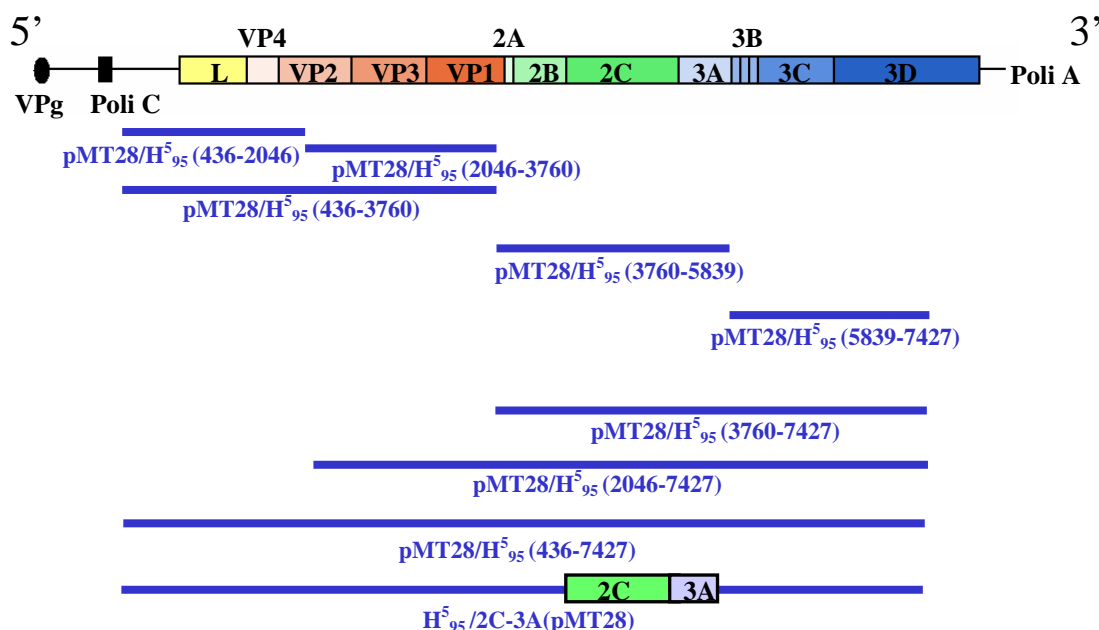


Figura 5.15. **Virus quiméricos C-S8c1/H⁵₉₅**. El esquema representa el genoma de C-S8c1. Las zonas 5' y 3' no codificantes se indican con rayas horizontales y las zonas codificantes mediante rectángulos con el nombre de las proteínas codificadas. La proteína VPg y el tramo de poliC se representan como una elipse negra y un rectángulo negro, respectivamente, en la zona 5' no codificante. Las líneas azules corresponden a los distintos fragmentos de cDNA de H⁵₉₅ introducidos en el clon infeccioso pMT28, y por tanto a la región correspondiente a H⁵₉₅ de cada uno de los virus quiméricos. El resto de su genoma corresponde a C-S8c1. Debajo de cada línea azul se indica el nombre del correspondiente virus quimérico.

Antes de realizar los ensayos de virulencia con cada uno de los virus quiméricos, se determinó el título viral de los virus rescatados tras la transfección de células BHK-21 con los transcritos de los plásmidos quiméricos, mediante plaqueo en medio de agar semisólido en células BHK-21 (Materiales y Métodos, sección 4.3.2.) (Tabla 5.16.).

Tabla 5.16. Título viral de los virus quiméricos.

Virus ^a	Título viral (UFPs/ml) ^b
pMT28/H ⁵ ₉₅ (436-2046)	$(8,6 \pm 0,9) \times 10^6$
pMT28/H ⁵ ₉₅ (2046-3760)	$(9,9 \pm 1,2) \times 10^6$
pMT28/H ⁵ ₉₅ (436-3760)	$(9,3 \pm 0,8) \times 10^6$
pMT28/H ⁵ ₉₅ (3760-5839)	$(1,7 \pm 0,7) \times 10^7$
pMT28/H ⁵ ₉₅ (5839-7427)	$(8,8 \pm 0,9) \times 10^6$
pMT28/H ⁵ ₉₅ (3760-7427)	$(9,3 \pm 0,6) \times 10^6$
pMT28/H ⁵ ₉₅ (2046-7427)	$(8,2 \pm 0,8) \times 10^6$
pMT28/H ⁵ ₉₅ (436-7427)	$(7,5 \pm 1,0) \times 10^6$
H ⁵ ₉₅	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^6$
C-S8c1	$(7,5 \pm 0,6) \times 10^7$
C-S8c1(pMT28)	$(1,8 \pm 1,0) \times 10^7$

^a El origen de los virus H⁵₉₅, C-S8c1 y C-S8c1 (pMT28) y el procedimiento de construcción de los virus quiméricos se describe en Materiales y Métodos (secciones 4.2.1. y 4.11.2.).

^b Las determinaciones se realizaron por triplicado. La tabla representa los valores medios y las desviaciones estándar. En la parte inferior de la tabla se indica el título viral de H⁵₉₅, C-S8c1 y C-S8c1(pMT28), para poder comparar con el de los virus quiméricos.

Como muestra la Tabla 5.16. el título viral de los virus quiméricos es similar al de C-S8c1(pMT28) y C-S8c1. Únicamente los virus quiméricos pMT28/H⁵₉₅ (2046-7427) y pMT28/H⁵₉₅ (436-7427), es decir, los que poseen una mayor región del genoma correspondiente a H⁵₉₅, presentan un título viral ligeramente menor que el resto, y más próximo al de H⁵₉₅.

Los ensayos de virulencia realizados para determinar la capacidad de matar células BHK-21 de los virus quiméricos se llevaron a cabo tal como se describe en Materiales y Métodos (sección 4.4). Además de las quimeras, en todos los ensayos se incluyeron los virus C-S8c1, C-S8c1(pMT28) y H⁵₉₅. La virulencia de C-S8c1(pMT28) resultó ser muy similar a la de C-S8c1 en todos los ensayos realizados.

La Figura 5.16. muestra el ensayo de virulencia de los virus quiméricos pMT28/H⁵₉₅ (436-2046), pMT28/H⁵₉₅ (2046-3760) y pMT28/H⁵₉₅ (436-3760).

La quimera **pMT28/H⁵₉₅ (436-2046)**, que posee la región comprendida entre los nucleótidos 436 y 2046 del H⁵₉₅ y el resto del genoma de C-S8c1, incluye dos mutaciones en el IRES, una que aparece como consecuencia de pases a alta m.d.i. en células BHK-21 y otra que lo hace como consecuencia de pases placa a placa (Tablas 5.13. y 5.15.).

La quimera **pMT28/H⁵₉₅ (2046-3760)**, que posee la región comprendida entre los nucleótidos 2046 y 3760 del H⁵₉₅ y el resto del genoma de C-S8c1, incluye tres mutaciones que aumentan la carga positiva en la cápsida y aparecen como consecuencia de pases a alta m.d.i. en células BHK-21 (Tablas 5.13 y 5.15.).

La quimera **pMT28/H⁵₉₅ (436-3760)** es la unión de las dos anteriores, es decir, que posee la región comprendida entre los nucleótidos 436 y 3760 del H⁵₉₅ y el resto del genoma de C-S8c1.

Como muestra la Tabla 5.17. los virus pMT28/H⁵₉₅ (436-2046), pMT28/H⁵₉₅ (2046-3760) y pMT28/H⁵₉₅ (436-3760) son aproximadamente 1,5, 5,8 y 6 veces más virulentos que C-S8c1, respectivamente. Este resultado sugiere que las mutaciones en el IRES de H⁵₉₅, por sí solas, no tienen un efecto significativo en virulencia. En cambio, las mutaciones que aumentan la carga positiva en la cápsida implican un incremento de virulencia respecto a C-S8c1 de aproximadamente 5,8 veces. La presencia simultánea de las mutaciones del IRES y las que aumentan la carga positiva en la cápsida [pMT28/H⁵₉₅ (436-3760)] resulta en una virulencia prácticamente idéntica a la mostrada por la quimera pMT28/H⁵₉₅ (2046-3760).

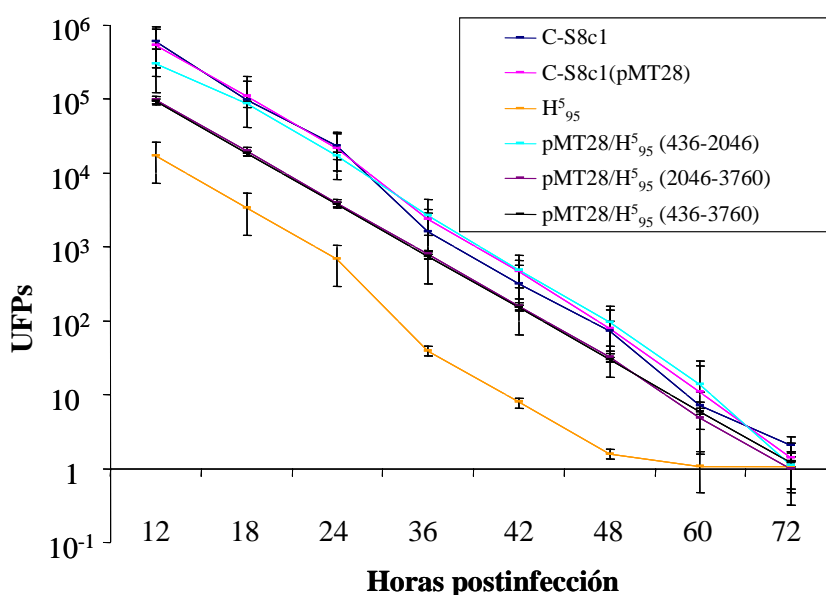


Figura 5.16. Variación del mínimo número de UFPs de los virus quiméricos pMT28/H⁵₉₅ (436-2046), pMT28/H⁵₉₅ (2046-3760) y pMT28/H⁵₉₅ (436-3760) necesarias para lisar 10⁴ células en función del tiempo. Los virus empleados en el ensayo se describen en Materiales y Métodos (sección 4.2.2.). Las determinaciones se realizaron por triplicado. La figura muestra los valores medios y las desviaciones estándar.

Tabla 5.17. Virulencia de los virus quiméricos pMT28/H⁵₉₅ (436-2046), pMT28/H⁵₉₅ (2046-3760) y pMT28/H⁵₉₅ (436-3760).

Virus ^a	Virulencia (12-24 h.p.i.) ^b
pMT28/H ⁵ ₉₅ (436-2046)	Aprox. 1,5 veces el valor para C-S8c1
pMT28/H ⁵ ₉₅ (2046-3760)	Aprox. 5,8 veces el valor para C-S8c1
pMT28/H ⁵ ₉₅ (436-3760)	Aprox. 6 veces el valor para C-S8c1

^a El procedimiento de construcción de los virus quiméricos se describe en Materiales y Métodos (sección 4.11.2.).

^b Los valores de virulencia relativos a C-S8c1 corresponden a los valores medios de los cocientes entre las UFPs necesarias para lisar 10⁴ células BHK-21 de C-S8c1 y las UFPs necesarias para lisar 10⁴ células BHK-21 de cada uno de los virus quiméricos entre las 12 y 24 h.p.i. La tendencia de la virulencia se mantiene en todos los casos hasta tiempos tardíos.

La Figura 5.17. representa la virulencia de los virus quiméricos pMT28/H⁵₉₅ (3760-5839), pMT28/H⁵₉₅ (5839-7427) y pMT28/H⁵₉₅ (3760-7427).

La quimera **pMT28/H⁵₉₅ (3760-5839)**, que posee la región comprendida entre los nucleótidos 3760 y 5839 del H⁵₉₅ y el resto del genoma de C-S8c1, incluye cambios de aminoácido en las proteínas no estructurales 2B, 2C y 3A (Tablas 5.13 y 5.15.).

La quimera **pMT28/H⁵₉₅ (5839-7427)**, que posee la región comprendida entre los nucleótidos 5839 y 7427 del H⁵₉₅ y el resto del genoma de C-S8c1, presenta mutaciones que no implican cambio de aminoácido en las proteínas no estructurales 3C y 3D (Tablas 5.13 y 5.15.).

La quimera **pMT28/H⁵₉₅ (3760-7427)** posee la región comprendida entre los nucleótidos 3760 y 7427 del H⁵₉₅ y el resto del genoma de C-S8c1.

Como se observa en la Tabla 5.18. las quimeras pMT28/H⁵₉₅ (3760-5839) y pMT28/H⁵₉₅ (3760-7427) muestran la misma virulencia, mientras que la quimera pMT28/H⁵₉₅ (5839-7427) apenas presenta diferencias respecto a C-S8c1. Este resultado es coherente, ya que las mutaciones presentes en la secuencia de las quimera pMT28/H⁵₉₅ (5839-7427) no implican cambio de aminoácido. Los cambios de aminoácido en las proteínas no estructurales 2B, 2C y 3A suponen un incremento de virulencia de aproximadamente 9 veces, respecto a la virulencia de C-S8c1.

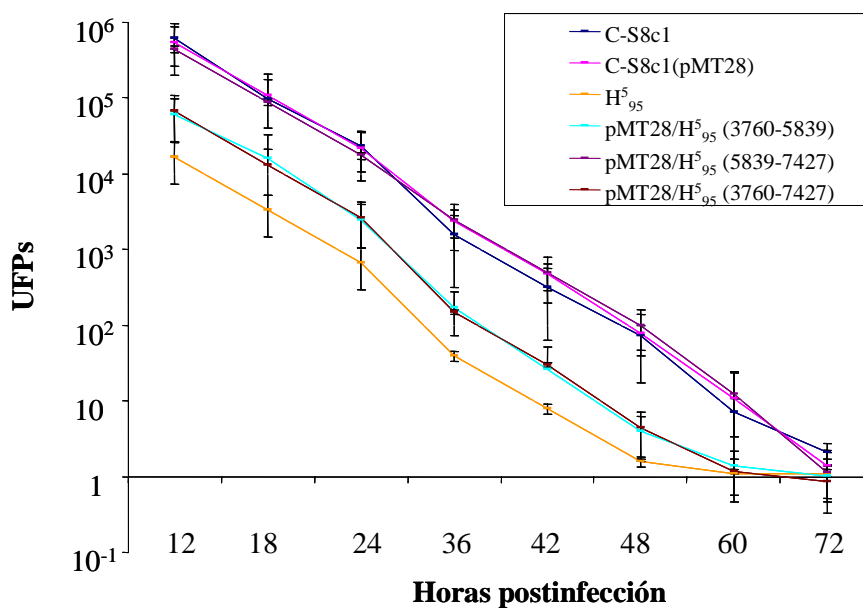


Figura 5.17. Variación del mínimo número de UFPs de los virus quiméricos pMT28/H⁵₉₅ (3760-5839), pMT28/H⁵₉₅ (5839-7427) y pMT28/H⁵₉₅ (3760-7427) necesarias para lisar 10⁴ células en función del tiempo. Los virus empleados en el ensayo se describen en Materiales y Métodos (sección 4.2.2.). Las determinaciones se realizaron por triplicado. La figura muestra los valores medios y las desviaciones estándar.

Tabla 5.18. Virulencia de los virus quiméricos pMT28/H⁵₉₅ (3760-5839), pMT28/H⁵₉₅ (5839-7427) y pMT28/H⁵₉₅ (3760-7427).

Virus ^a	Virulencia (12-24 h.p.i.) ^b
pMT28/H ⁵ ₉₅ (3760-5839)	Aprox. 9 veces el valor para C-S8c1
pMT28/H ⁵ ₉₅ (5839-7427)	Aprox. igual a C-S8c1
pMT28/H ⁵ ₉₅ (3760-7427)	Aprox. 9 veces el valor para C-S8c1

^a El procedimiento de construcción de los virus quiméricos se describe en Materiales y Métodos (sección 4.11.2.).

^b Los valores de virulencia relativos a C-S8c1 corresponden a los valores medios de los cocientes entre las UFPs necesarias para lisar 10⁴ células BHK-21 de C-S8c1 y las UFPs necesarias para lisar 10⁴ células BHK-21 de cada uno de los virus quiméricos entre las 12 y 24 h.p.i. La tendencia de la virulencia se mantiene en todos los casos hasta tiempos tardíos.

En la Figura 5.18. y Tabla 5.19. se compara la virulencia de los virus quiméricos **pMT28/H⁵₉₅ (2046-7427)** y **pMT28/H⁵₉₅ (436-7427)**. Los datos confirman que la presencia simultánea de mutaciones que aumentan la carga positiva en la cápsida y cambios de aminoácido en las proteínas 2B, 2C y 3A [(pMT28/H⁵₉₅ (2046-7427))] implican un incremento de virulencia relativo a C-S8c1 de aproximadamente 16 veces. La inclusión de la zona del IRES de H⁵₉₅ a la secuencia de la quimera pMT28/H⁵₉₅ (2046-7427) [pMT28/H⁵₉₅ (436-7427)] no afecta a la virulencia para células BHK-21.

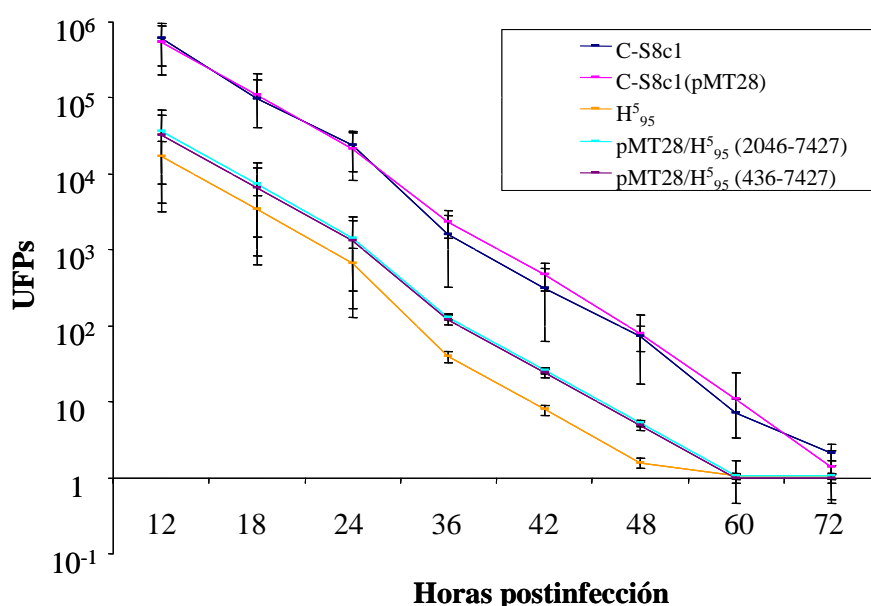


Figura 5.18. Variación del mínimo número de UFPs de los virus quiméricos **pMT28/H⁵₉₅ (2046-7427)** y **pMT28/H⁵₉₅ (436-7427)** necesarias para lisar 10⁴ células en función del tiempo. Los virus empleados en el ensayo se describen en Materiales y Métodos (sección 4.2.2.). Las determinaciones se realizaron por triplicado. La figura muestra los valores medios y las desviaciones estándar.

Tabla 5.19. Virulencia de los virus quiméricos pMT28/H⁵₉₅ (2046-7427) y pMT28/H⁵₉₅ (436-7427).

Virus ^a	Virulencia (12-24 h.p.i.) ^b
pMT28/H ⁵ ₉₅ (2046-7427)	Aprox. 16 veces el valor para C-S8c1
pMT28/H ⁵ ₉₅ (436-7427)	Aprox. 17,5 veces el valor para C-S8c1

^a El procedimiento de construcción de los virus quiméricos se describe en Materiales y Métodos (sección 4.11.2.).

^b Los valores de virulencia relativos a C-S8c1 corresponden a los valores medios de los cocientes entre las UFPs necesarias para lisar 10⁴ células BHK-21 de C-S8c1 y las UFPs necesarias para lisar 10⁴ células BHK-21 de cada uno de los virus quiméricos entre las 12 y 24 h.p.i. La tendencia de la virulencia se mantiene en todos los casos hasta tiempos tardíos.

Por tanto, los resultados demuestran que la virulencia de VFA para células BHK-21 es un carácter poligénico y sugieren que los principales determinantes de virulencia mapean en la región comprendida entre los residuos 3760 y 5839 (región codificante de las proteínas 2A, 2B, 2C y 3A), y entre los residuos 2046 y 3760 (región codificante de parte de la proteína VP2, la proteína VP3 y parte de la proteína VP1).

5.17.- La proteína no estructural 2C es un determinante de la virulencia de VFA en células BHK-21

Trabajos previos han relacionado cambios de aminoácido en la proteína 2C de rinovirus humano con un aumento de virulencia para células L de ratón (Harris y Racaniello 2003). Uno de estos cambios mapea en la misma región de la proteína 2C que las sustituciones T 256 A y Q 263 H de H⁵₉₅, MARLS y C-S8p260p3d (virus descritos en Materiales y Métodos, sección 4.2.1), lo que sugiere su posible implicación en virulencia. Además resulta interesante que VFA como H⁵₉₅, MARLS y C-S8p260p3d, con una historia evolutiva distinta (Introducción, Figura 2.5.), compartan los cambios de aminoácido S 80 N, T 256 A y Q 263 H en la proteína 2C. MARLS y C-S8p260p3d presentan, además de los tres comunes a H⁵₉₅, el cambio de aminoácido M 283 V en la proteína 2C (Tabla 5.20.).

Tabla 5.20. Mutaciones que implican cambio de aminoácido en la proteína 2C de H⁵₉₅, MARLS y C-S8p260p3d en relación con C-S8c1.

Región	Mutación ^a	Aminoácido en H ⁵ ₉₅ ^b	Aminoácido en MARLS ^b	Aminoácido en C-S8p260p3d ^b
2C	G-4583-A	S 80 N	S 80 N	S 80 N
	U-4812-C	-	*	*
	C-4824-U	*	*	-
	U-5077-C	-	*	*
	A-5110-G	T 256 A	T 256 A	T 256 A
	G-5133-C	Q 263 H	Q 263 H	Q 263 H
	A-5191-G	*	M 283 V	M 283 V
	C-5214-U	*	*	-

^a La primera letra corresponde al nucleótido encontrado en el virus parental C-S8c1; el número indica la posición de dicho nucleótido en el genoma de C-S8c1.

^b Se usa el código de una letra para los aminoácidos (descrito en Abreviaturas); el primer aminoácido es el presente en C-S8c1 y el número indica la posición de dicho aminoácido en 2C; -, indica una mutación silenciosa; *, indica que carece de la mutación indicada en la misma fila; los recuadros azules indican los cambios de aminoácido comunes a C-S8c1, MARLS y C-Sp260p3d.

La proteína 2C está implicada en síntesis de RNA y contiene una región de unión a NTPs (Introducción, sección 2.3.1.2.), aunque ninguno de estos tres cambios de aminoácido (S 80 N, T 256 A y Q 263 H) está dentro de esa región (Figura 5.19.).

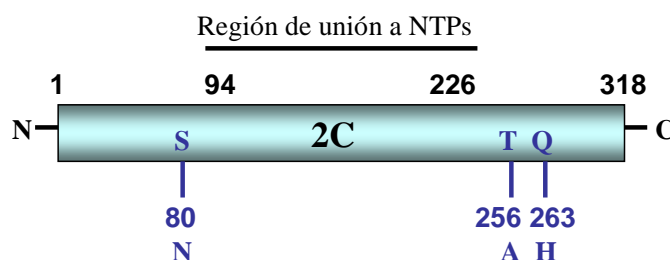


Figura 5.19. Esquema de la proteína 2C de VFA. La figura muestra la región de unión NTPs de la proteína 2C. Los números en negro indican el número de aminoácido. En azul se indican los tres cambios de aminoácido comunes presentes en la secuencia H⁵₉₅, MARLS y C-S8p260p3d. La numeración de los residuos del VFA es la descrita en Toja y cols. (1999).

Con el objetivo de analizar la contribución de estos tres cambios de aminoácido en la proteína 2C a la alta virulencia mostrada por H⁵₉₅, se introdujeron dichas mutaciones individualmente en el clon infeccioso pMT28 mediante mutagénesis dirigida, tal como se describe en Materiales y Métodos (sección 4.11.1.). Se transfectaron células BHK-21 con los transcritos de los tres mutantes obtenidos, y los virus resultantes [denominados **pMT28(SN)**, **pMT28(TA)** y **pMT28(QH)**, descritos en Materiales y Métodos, sección 4.2.2.] se titularon mediante ensayos de plaqueo (Tabla 5.21.) y se emplearon en ensayos de virulencia (Figura 5.20.). De nuevo, incluimos el virus C-S8c1(pMT28) como control en todos los ensayos, ya que los virus mutantes de la 2C se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida del clon infeccioso pMT28.

Tabla 5.21. **Título viral de los mutantes de la proteína 2C.**

Virus^a	Título viral (UFPs/ml)^b
pMT28(SN)	$(4,2 \pm 0,9) \times 10^7$
pMT28(TA)	$(4,4 \pm 0,8) \times 10^7$
pMT28(QH)	$(4,0 \pm 0,9) \times 10^7$
pMT28(SN, TA, QH)	$(5,0 \pm 0,3) \times 10^7$
H ⁵ ₉₅	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^7$
C-S8c1	$(7,5 \pm 0,6) \times 10^7$
C-S8c1(pMT28)	$(1,8 \pm 1,0) \times 10^7$

^a El origen de los virus H⁵₉₅, C-S8c1 y C-S8c1 (pMT28) y el procedimiento de construcción de los virus mutantes se describe en Materiales y Métodos (secciones 4.2.1. y 4.11.1.).

^b Las determinaciones se realizaron por triplicado. La tabla representa los valores medios y las desviaciones estándar. En la parte inferior de la tabla se indica el título viral de H⁵₉₅, C-S8c1 y C-S8c1(pMT28), para comparar con el de los virus mutantes.

Como indican los resultados de la Tabla 5.21., las mutaciones en 2C no incrementan el título viral. En cambio, los ensayos de virulencia (Figura 5.20.) indican que la virulencia de los tres mutantes individuales es similar entre ellos y unas 7,5 veces superior a la virulencia de C-S8c1, es decir, intermedia entre la de C-S8c1 y la de H⁵₉₅.

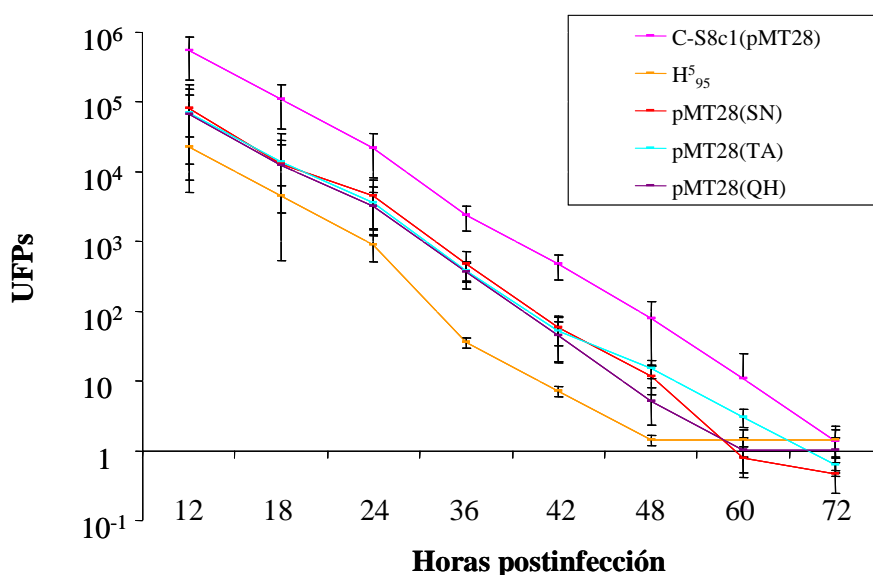


Figura 5.20. Variación del mínimo número de UFPs de los mutantes de la proteína 2C [pMT28(SN), pMT28(TA) y pMT28(QH)] necesarias para lisar 10^4 células en función del tiempo. Los virus empleados en el ensayo se describen en Materiales y Métodos (sección 4.2.2.). Las determinaciones se realizaron por triplicado. La figura muestra los valores medios y las desviaciones estándar.

Para analizar si la combinación de las tres sustituciones en 2C incrementa todavía más la virulencia de C-S8c1, se introdujeron las tres mutaciones juntas en el clon infeccioso y se realizaron ensayos de virulencia con este triple mutante [denominado **pMT28(SN, TA, QH)**, descrito en Materiales y Métodos, sección 4.2.2.]. Los resultados (Figura 5.21. y Tabla 5.21.) indican que el título viral del triple mutante no varía respecto a C-S8c1 y que la virulencia del triple mutante es indistinguible de la de los mutantes individuales.

Por tanto, los resultados de mutagénesis dirigida indican que 2C es un determinante de virulencia de VFA para células BHK-21.

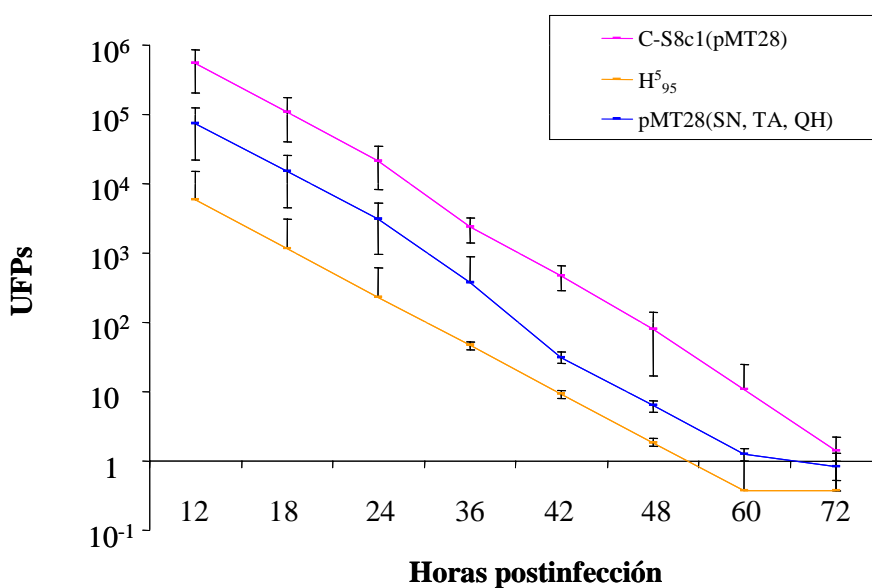


Figura 5.21. Variación del mínimo número de UFPs del triple mutante de la proteína 2C [pMT28(SN, TA, QH)] necesarias para lisar 10^4 células en función del tiempo. Los virus empleados en el ensayo se describen en Materiales y Métodos (sección 4.2.2.). Las determinaciones se realizaron por triplicado. La figura muestra los valores medios y las desviaciones estándar.

5.18.- La introducción de la proteína no estructural 2C de C-S8c1 en el contexto de secuencia de H⁵₉₅ reduce la virulencia de H⁵₉₅

Para evaluar la contribución de las sustituciones en la proteína 2C a la virulencia mostrada por H⁵₉₅, se construyó un virus quimérico con las proteínas 2C y 3A “wild-type” (C-S8c1) en el contexto de secuencia de H⁵₉₅ [quimera pMT28/H⁵₉₅ (436-7427)] al que se denominó quimera H⁵₉₅/2C-3A(pMT28) (descrita en Materiales y Métodos, sección 4.2.2.). Este virus debería mostrar una virulencia inferior a la de H⁵₉₅. Se determinó su título viral mediante ensayo de plaqueo (Tabla 5.22.) y se realizaron ensayos de virulencia (Figura 5.22.).

Como muestra la Tabla 5.22. la quimera H⁵₉₅/2C-3A(pMT28) produjo un título viral ligeramente menor que el resto de quimeras empleadas en ensayos de virulencia descritos anteriormente (sección 4.15.13.), y más próximo al de H⁵₉₅, al igual que ocurría con las quimeras pMT28/H⁵₉₅ (2046-7427) y pMT28/H⁵₉₅ (436-7427).

Tabla 5.22. Título viral del virus quimérico $H^5_{95}/2C-3A(pMT28)$.

Virus ^a	Título viral (UFPs/ml) ^b
$H^5_{95}/2C-3A(pMT28)$	$(8,0 \pm 0,5) \times 10^6$
H^5_{95}	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^6$
C-S8c1	$(7,5 \pm 0,6) \times 10^7$
C-S8c1(pMT28)	$(1,8 \pm 1,0) \times 10^7$

^a El origen de los virus H^5_{95} , C-S8c1 y C-S8c1 (pMT28) y el procedimiento de construcción del virus quimérico se describe en Materiales y Métodos (secciones 4.2.1. y 4.11.2.).

^b Las determinaciones se realizaron por triplicado. La tabla representa los valores medios y las desviaciones estándar. En la parte inferior de la tabla se indica el título viral de H^5_{95} , C-S8c1 y C-S8c1(pMT28), para poder comparar con el del virus quimérico.

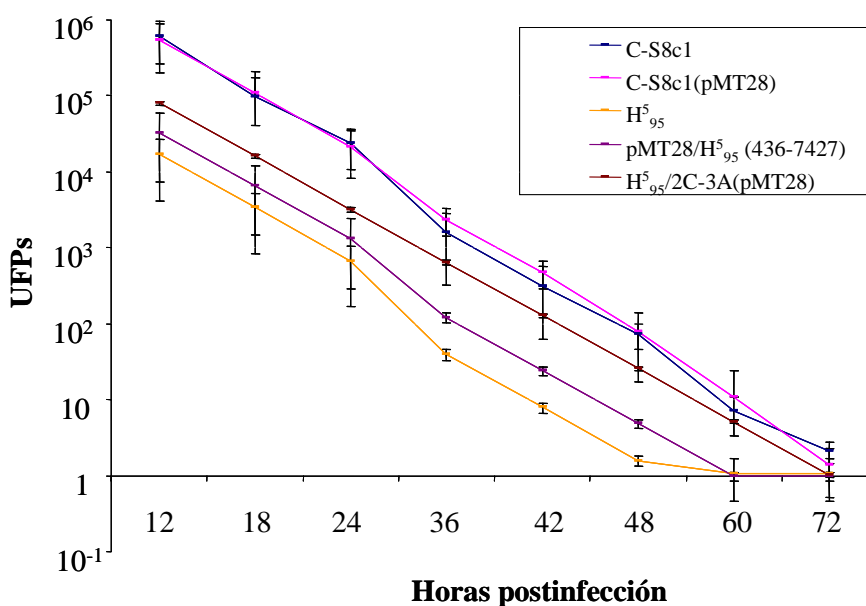


Figura 5.22. Variación del mínimo número de UFPs del virus quimérico $H^5_{95}/2C-3A(pMT28)$ necesarias para lisar 10^4 células en función del tiempo. Los virus empleados en el ensayo se describen en Materiales y Métodos (sección 4.2.2.). Las determinaciones se realizaron por triplicado. La figura muestra los valores medios y las desviaciones estándar.

La presencia de la región codificante “wild-type” de las proteínas 2C y 3A en la quimera H⁵₉₅/2C-3A(pMT28) implica una reducción de virulencia de 10 veces respecto a la quimera pMT28/H⁵₉₅ (436-7427) y de 5 veces respecto a H⁵₉₅, y un aumento de aproximadamente 6 veces respecto a C-S8c1.

Por tanto, un virus que evoluciona hacia bajos niveles de “fitness” como consecuencia de la actuación del trinquete de Muller puede, no obstante, mantener su capacidad de matar las mismas células en las que presentan bajo “fitness”. En VFA, la capacidad de incrementar la virulencia o capacidad de matar células es multigénica, e incluye la participación de la proteína no estructural 2C, identificada en esta Tesis Doctoral como nuevo determinante de virulencia de VFA para células BHK-21. En conclusión, el “fitness” y la virulencia de un virus animal pueden ser dos características independientes.

5.19.- Virulencia de VFA en el establecimiento de persistencia

Otro abordaje para estudiar virulencia o capacidad de matar células por VFAs que difieren en valor relativo de “fitness”, consistió en analizar el índice de supervivencia celular en el proceso del establecimiento de una infección persistente en células BHK-21.

Para establecer líneas celulares de BHK-21 persistentemente infectadas (sección 4.1.; de la Torre y cols. 1985), se realiza una primera infección (*infección a*). Las células supervivientes forman una nueva monocapa que es infectada por segunda vez (*infección b*). La monocapa que se forma a partir de las células supervivientes de esta segunda infección son las que reciben el nombre de células R (Figura 5.23.). Este protocolo de establecimiento de persistencia se aplicó a virus que difieren en valor relativo de “fitness”: MARLS, H⁵₉₅ y C-S8c1 (descritos en Materiales y Métodos, sección 4.2.1.). Además se incluyeron los virus mutantes de la proteína 2C [pMT28(SN), pMT28(TA), pMT28(QH) y pMT28(SN, TA, QH), descritos en Materiales y Métodos, sección 4.2.2.] para analizar el efecto de dichas mutaciones en el comportamiento de los virus en el establecimiento de persistencia.

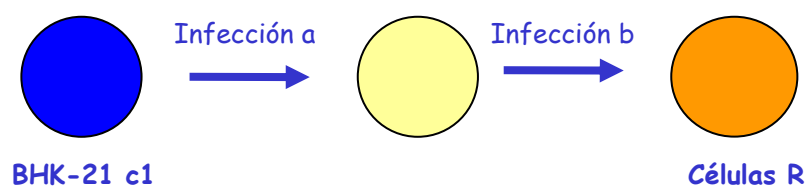


Figura 5.23. **Infecciones iniciales para establecer infecciones persistentes en células BHK-21.** La circunferencia azul representa una monocapa confluyente de BHK-21. La circunferencia amarilla representa células BHK-21 que han sobrevivido a la primera infección con virus y son capaces de formar una nueva monocapa. La circunferencia naranja representa las células R persistentemente infectadas que han sobrevivido a la segunda infección con el virus.

Se infectaron monocapas de células BHK-21 a una m.d.i. de 0,1 UFPs/célula con cada uno de los virus (*infección a*) y se analizó el índice de supervivencia celular a las 48 h.p.i. En los casos en los que se pudo formar una monocapa a partir de las células supervivientes se realizó una segunda infección (*infección b*) y se analizó de nuevo el índice de supervivencia celular a las 48 h.p.i. (Tabla 5.23.).

Tabla 5.23. **Índice de supervivencia celular tras las infecciones a y b en el establecimiento de persistencia^a.**

Infección ^b	MARLS	H ₉₅ ⁵	C-S8c1	C-S8c1 (pMT28)	pMT28 (SN)	pMT28 (TA)	pMT28 (QH)	pMT28 (SN,TA,QH)
a	$< 4 \times 10^{-4}$	$< 4 \times 10^{-4}$	$9,9 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$
b	—	—	$3,7 \times 10^{-2}$	$4,7 \times 10^{-2}$	$5,5 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-3}$	$4,9 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-3}$

^a El índice de supervivencia celular se determinó por duplicado mediante conteo del número de células en el hemocitómetro. La tabla representa los valores medios. El límite de detección fue de 4×10^{-4} células supervivientes. Se determinó el índice de supervivencia de C-S8c1(pMT28) como control, ya que los mutantes de la proteína 2C se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida en dicho clon infeccioso. — indica que no fue posible obtener una monocapa de células supervivientes tras la *infección a* (índice de supervivencia $< 4 \times 10^{-4}$).

^b Infecciones a y b sucesivas, tal como se detalla en el texto y la Figura 5.23.

Este resultado corrobora los obtenidos anteriormente (sección 4.15.3.; 4.16.; 4.17.). De nuevo MARLS y H⁵₉₅ muestran la mayor virulencia, ya que son incapaces de establecer persistencia en células BHK-21 al dejar un índice de supervivencia tras la *infección a* por debajo del límite de detección. C-S8c1 y C-S8c1(pMT28) presentan una virulencia muy similar, ya que dejan un índice de supervivencia celular (tanto tras la *infección a* como tras la *infección b*) prácticamente idéntico. Los mutantes de la proteína 2C (tanto los mutantes individuales como el triple mutante) presentan un índice de supervivencia celular muy similar entre ellos y aproximadamente un logaritmo inferior a C-S8c1 y C-S8c1(pMT28). En todos los casos se observa que el índice de supervivencia tras la *infección b* es ligeramente superior al obtenido tras la *infección a*.

En conclusión, la virulencia o capacidad de matar células BHK-21 de VFA puede ser una característica independiente del “fitness” viral, siendo sus determinantes multigénicos. Los cambios de aminoácido en la proteína 2C aportan una contribución importante a la elevada virulencia del H⁵₉₅ para las células BHK.21.

Discusión

6.- Discusión

6.1.- Coevolución del virus y las células durante la persistencia del VFA en células BHK-21

Procesos de coevolución entre virus y células como los caracterizados en esta Tesis Doctoral han sido descritos para varios sistemas virales, como reovirus (Ahmed y cols. 1981), poliovirus (Calvez y cols. 1995), rotavirus (Charini y cols. 1983; Mrukowicz y cols. 1998), poliomavirus (Delli Bovi y cols. 1984), virus herpes simplex tipo 1 (Cummings y Rinaldo 1989), virus de la hepatitis de ratón (Chen y Baric 1996) y virus diminuto de ratón (Ron y Tal 1985, 1986).

Un sistema celular persistente tiene como propiedad inherente la selección de aquellos virus variantes capaces de replicar permitiendo la división celular (con la segregación de genomas virales entre las células hijas) antes de la muerte celular. Esta situación, que permite la perpetuación de un sistema célula-virus intracelular estable, será más favorable durante períodos de activa división celular que durante la inhibición por contacto. Este modelo de persistencia, que ha sido denominado cinético (de la Torre y cols. 1985), podría operar a lo largo de los pases de las células R, con la ventaja adicional que supone la continua selección de nuevos variantes virales y celulares que interactúan para conferir una creciente estabilidad al conjunto. Una población de células persistentemente infectadas con un virus y que evoluciona hacia una mayor resistencia a la infección por el mismo virus tiene que desarrollar algún mecanismo que potencie esta resistencia (inducción de inhibidores de la replicación viral, disminución de la expresión de receptores necesarios para el virus, etc). A su vez los virus deben desarrollar mecanismos para superar la barrera impuesta por la célula, incluyendo el reconocimiento de receptores alternativos. Estos sistemas constituyen ejemplos de coevolución entre una célula y su virus residente, constituyendo modelos abordables a nivel molecular de procesos evolutivos que se dan también entre organismos diferenciados (Futuyma y Slatkin 1983; Woolhouse y cols. 2002).

6.2.- Repetición de acontecimientos en la evolución vírica

En el inicio de esta Tesis Doctoral nos preguntamos si al establecerse de nuevo líneas celulares persistentemente infectadas por C-S8c1, siguiendo el mismo método descrito en trabajos anteriores de nuestro laboratorio (de la Torre y cols. 1985), se repetiría la coevolución virus-célula y si se seleccionarían las mismas variantes virales y celulares. Con el objetivo de poder responder a esta pregunta, se establecieron nuevas líneas de BHK-21 persistentemente infectadas con C-S8c1 (Resultados, sección 5.1.) y se han estudiado distintos aspectos celulares (morfología, índice de crecimiento, resistencia a infección) y virales (evolución de la infectividad y las moléculas de RNA viral de polaridad positiva y negativa, virulencia, termosensibilidad y secuencia de los virus R) desde el comienzo de la persistencia hasta el pase 100 en las dos nuevas líneas de persistencia de VFA en células BHK-21 (serie RB y serie RD). Los resultados (descritos en Resultados, secciones 5.3.-5.12.) han mostrado un sorprendente paralelismo en la evolución en ambas líneas celulares (RB y RD) y varias características comunes con la línea de persistencia establecida anteriormente en nuestro laboratorio (de la Torre y cols. 1985).

6.2.1.- Principales características de las células R

Las características que comparten las tres líneas de células BHK-21 persistentemente infectadas con C-S8c1 estudiadas son: presencia de RNA viral en todos los pases, oscilaciones de la infectividad y la carga viral (hay pases que no son productivos, en los que no se detecta infectividad y muestran un bajo número de moléculas de RNA intracelulares y extracelulares, y pases en los que se detectan picos de infectividad y de RNA), crisis de efecto citopático de las células R al alcanzar la confluencia, morfología redondeada, aumento del índice de crecimiento celular, disminución de la inhibición por contacto y resistencia a infección con VFA (Resultados, secciones 5.2., 5.3., 5.4., 5.5. y 5.11.).

La capacidad de las células BHK-21 persistentemente infectadas de variar genéticamente podría ser favorecida por el grado de transformación que muestran las células R (Pujol y Devesa 2005).

6.2.2.- Principales características fenotípicas y genotípicas de los virus R

Las características que comparten los virus que han coevolucionado con las células, en las tres líneas de BHK-21 infectadas con C-S8c1 estudiadas son: morfología de placa pequeña, carácter termosensible, incremento de virulencia en células BHK-21 y dos cambios de aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína VP3 (D 9 A y N 13 H) (Resultados, secciones 5.6., 5.7. y 5.9.).

Algunas de las características fenotípicas del virus fijadas durante la persistencia, como el tamaño de placa y el carácter termosensible revierten parcial o totalmente en infecciones citolíticas (Sevilla y Domingo 1996), lo cual sugiere que dichas características se seleccionan en respuesta al ambiente modificado que representa la persistencia. Sin embargo, la hipervirulencia que adquieren los virus R durante la persistencia no sólo no revierte, sino que se acentúa más después de 100 pases en infecciones citolíticas (Sevilla y Domingo 1996; Sáiz y Domingo 1996). Se puede establecer una distinción entre una evolución fenotípica irreversible de ciertos caracteres, como la hipervirulencia, y una evolución fenotípica reversible de otros caracteres (como el carácter termosensible).

La comparación de la secuencia de los virus R de las dos nuevas series de persistencia con la de virus R de la primera infección persistente establecida en nuestro laboratorio, muestra que la evolución también se repite, al menos en parte, a nivel genético, ya que dos de los cuatro cambios de aminoácido presentes en la proteína VP3 del virus R (de los pases 99, 100 y 146) de la primera línea de persistencia (D 9 A y N 13 H) (Toja y cols. 1999; Díez y cols. 1990) también aparecen en el genoma del virus R del pase 45 de las nuevas líneas de persistencia, y se mantienen hasta el pase 100 (Resultados, sección 5.9.). Las sustituciones C 7 V, D 9 A y N 13 H fueron inicialmente asociadas al fenómeno de persistencia (Díez y cols., 1990; Gebauer y cols. 1988), pero han aparecido en aislados de nuestro laboratorio sin ninguna relación con ese fenómeno como los virus HRp100 y HRp57, que fueron obtenidos permitiendo una optimización de la eficacia biológica del mutante MAR HR mediante pases líticos seriados (Holguín 1996). Estas coincidencias no descartan que estas sustituciones aparezcan con más frecuencia en infecciones persistentes y así el cambio D 9 A aparece también en aislados rescatados de infecciones persistentes en animales (Gebauer y cols. 1988).

Existen evidencias recientes de la existencia de una cadena de acontecimientos compensatorios ligados en una región definida de la cápsida del VFA durante

infecciones citolíticas, así como la existencia de un “cluster” de sustituciones de aminoácidos en virus procedentes de infecciones persistentes, que también pueden aparecer en infecciones citolíticas en respuesta a cambios causados por mutaciones previas. La introducción de dos de los cuatro cambios de aminoácido del extremo N-terminal de la proteína VP3 del virus VR100, C 7 V y M 14 L, en la cápsida de C-S8c1 no afectaba al tamaño de placa y la producción viral durante infecciones líticas, ni a la estabilidad del virión, pero sí provocaba una pérdida de “fitness”. En cambio, la mutación D 9 A (uno de los dos cambios de aminoácido comunes a los virus provenientes del pase 100 de las tres infecciones persistentes estudiadas) provocaba una drástica reducción del tamaño de placa y la viabilidad. La competición del mutante C 7 V con virus “wild-type” implicaba la fijación de la mutación D 9 A en la cápsida C 7 V, y, por otra parte, la presencia de la mutación D 9 A conducía a la fijación de la mutación M 14 L. Estas dos mutaciones, desventajosas individualmente, conducían juntas a un incremento de “fitness” del doble mutante (Mateo y Mateu 2006).

En las cápsidas con simetría icosaédrica, los residuos más expuestos de la superficie tienden a ser más tolerantes a los reemplazamientos que los residuos internos de la cápsida, que participan en un número mayor de interacciones con otros aminoácidos (Lea y cols. 1994; Escarmís y cols. 1996). Las dos sustituciones de aminoácido encontradas en VP3 se agrupan en la superficie de la partícula viral, en torno al eje de simetría de orden 5 de la cápsida del VFA. Además, tanto los virus R descritos en esta Tesis Doctoral como los virus R de la primera infección persistente establecida en nuestro laboratorio muestran alta virulencia para células BHK-21 y una morfología de placa pequeña (Díez y cols. 1990), lo que representa cambios genotípicos y fenotípicos similares en poblaciones virales procedentes de infecciones persistentes independientes. La repetida selección de dos mutaciones en la cápsida ha sido también observada durante infecciones persistentes de poliovirus en cultivos primarios de células de cerebro fetal humano (Pavio y cols. 1996).

Una de las características seleccionadas durante la persistencia es la hipervirulencia, característica que también se selecciona durante pases citolíticos masivos del VFA (Martínez y cols. 1991; Sevilla y Domingo 1996; Baranowski y cols., 1998). De este modo, mutaciones asociadas al fenómeno de persistencia pueden aparecer en virus hipervirulentos con distintas historias biológicas.

La posible ausencia de mutaciones exclusivas de persistencia se podría interpretar de varios modos. Se puede considerar que el fenotipo persistente está definido por una constelación de mutaciones, que separadamente también pueden ser encontradas en virus aislados en otras circunstancias. Según esta hipótesis, no una mutación sino varias son las que interaccionan de un modo complejo, aditivo o sinérgico, para dotar al virus con las características propias de un virus persistente.

6.3.- Proporción de moléculas de RNA de polaridad positiva y negativa

6.3.1.- Reducción de moléculas de RNA de polaridad positiva asociada a persistencia: posible contribución al mecanismo molecular de persistencia

Al analizar la evolución de las moléculas de RNA positivas y negativas a lo largo de la persistencia del VFA en células BHK-21 se observa que, de nuevo, la evolución en las dos líneas independientes de persistencia (serie RB y serie RD) fue muy paralela (Resultados, sección 5.5.5.). El nivel de moléculas de RNA negativas se mantiene aproximadamente constante a lo largo de los pases, mientras que el de cadenas positivas sufre grandes oscilaciones (Resultados, Figura 5.5.). Parece que hay algo que impide la encapsidación de cadenas positivas, ya que a partir del pase 50 aunque en la fracción intracelular hay cadenas positivas, incluso en mayor número que las negativas, en las correspondientes muestras extracelulares, es decir de RNA encapsidado, hay más cadena negativa que positiva (Resultados, Figuras 5.5.A. y 5.5.B.). Los resultados sugieren que tanto los virus como las células participan en el mantenimiento de un nivel de cadenas negativas superior al de positivas, quizás como resultado de la coevolución virus-célula, contribuyendo a la persistencia del virus (Resultados, sección 5.5.7.). Una de las consecuencias de la coevolución virus-célula sería la selección de variantes virales con defectos en la síntesis de RNA de polaridad positiva, así como la reducción de niveles de factores celulares necesarios para la síntesis de cadenas positivas del RNA viral.

Un exceso de RNA viral de cadena positiva sobre cadena negativa se ha observado de modo general durante la replicación de virus de cadena positiva tanto en cultivos celulares como *in vivo*. Así, el exceso de cadenas de polaridad positiva sobre cadenas de polaridad negativa en células HeLa infectadas con poliovirus es del orden de 30 a 70 veces (Novak y Kirkegaard 1991). En el hígado de pacientes infectados con el

virus de la hepatitis C también se observa un exceso de RNA de cadena positiva frente a negativa de aproximadamente 100-1000 veces (Komurian-Pradel y cols. 2004).

Algunos trabajos previos con virus RNA de polaridad positiva sugieren que la persistencia se caracteriza por una reducción de la síntesis de cadenas positivas, lo cual da lugar a niveles similares de RNA de polaridad positiva y negativa. En músculo de pacientes del síndrome de fatiga postviral se han detectado niveles similares de RNA de cadena positiva y negativa de enterovirus, mientras que en una infección lítica de células en cultivo se detecta aproximadamente 100 veces más de cadena positiva que negativa (Cunningham y cols. 1990). En músculo cardíaco de ratones con miocarditis crónica asociada a coxsackievirus B3 también se ha detectado un gran exceso de RNA de polaridad positiva frente a RNA de polaridad negativa, y aproximadamente la misma cantidad de cadenas positivas que negativas en el caso de infecciones cardíacas persistentes sin daño crónico en el miocardio, lo cual puede ser debido a un defecto en la replicación del RNA viral de polaridad positiva (Andreoletti y cols. 1997; Hohenadl y cols. 1991). En ratones con miopatía inflamatoria crónica se identificaron complejos de RNA de doble banda de coxsackievirus, manteniéndose niveles equivalentes de RNAs de polaridad positiva y negativa (Tam y Messner 1999).

6.3.3.- Regiones del genoma viral implicadas en regulación de síntesis de RNA de polaridad positiva y negativa

Diversas regiones del genoma de distintos virus se han asociado a la regulación de los niveles de cadenas de polaridad positiva y negativa. En poliovirus, la encapsidación es un evento altamente específico para moléculas de RNA de polaridad positiva, y la proteína VPg, unida covalentemente al extremo 5' tanto de las cadenas positivas como las negativas, no es el único determinante del empaquetamiento del RNA (Novak y Kirkegaard 1991). En este sistema se han descrito mutaciones en el cre que inhiben la uridilación de VPg y la síntesis de RNA de cadena positiva, pero no de RNA de cadena negativa (Murray y Barton 2003; Morasco y cols. 2003). También en poliovirus se ha descrito una mutación en el extremo C-terminal de la proteína 3A (M 79 V) que produce la inhibición selectiva de la síntesis de RNA de cadena positiva, pero no de RNA de cadena negativa ni la uridilación de VPg, por tanto el defecto en la síntesis ocurre en un paso posterior a la uridilación de VPg y la síntesis de RNA de cadena negativa (Teterina y cols. 2003). La eficiencia y especificidad de uridilación de

VPg por las polimerasas de picornavirus está muy influenciada por los efectos alostéricos de la unión de ligandos que pueden ser relevantes durante el ciclo replicativo viral (Boerner y cols. 2005). Estudios con el coxsackievirus B3 (CVB3) han determinado que mutaciones en el elemento *oriR*, que actúa en *cis* en el 3'UTR del RNA viral y determina la longitud del poliA en el extremo 3', inhiben la iniciación de la síntesis de RNA (-), sin afectar la longitud del poliU en el extremo 5' (van Ooij y cols. 2006a). Recientemente, se ha identificado un elemento replicativo que actúa en *cis* ("cis acting replication element" o cre) dentro de la región codificante 2C del CVB3 que es necesario para la iniciación de la síntesis de cadenas de RNA de polaridad positiva y juega un papel esencial en la iniciación eficiente de síntesis de cadenas de polaridad negativa (van Ooij y cols. 2006b). En el virus Sindbis se han relacionado varias regiones con la regulación de la replicación: el extremo 5' UTR, un elemento de secuencia conservada (CSE) de 51 nucleótidos en el extremo 5' implicado en iniciación de síntesis de cadena negativa y un elemento CSE de 19 nucleótidos en el extremo 3' UTR (Frolov y cols. 2001). En el virus Aichi se han identificado elementos en el extremo 5' del genoma que son críticos para la síntesis de RNA de cadena negativa y de cadena positiva (Nagashima y cols. 2005). En el virus del mosaico del bamboo (BaMV) también se han identificado 3 elementos que actúan en *cis* en el extremo 3' del RNA de cadena negativa que están implicados en modular la eficiencia de la síntesis de RNA viral de cadena positiva (Lin y cols. 2005). También se han descrito represores transcripcionales de síntesis de RNA de cadena negativa, como por ejemplo un RNA satélite (sat C) en el virus del arrugado del nabo (Zhang y cols. 2004).

Actualmente estamos planificando experimentos para mapear los determinantes de las alteraciones de RNA viral de polaridad positiva y negativa durante la persistencia del VFA en células BHK-21.

6.4.- Evolución de la virulencia y la capacidad replicativa ("fitness") durante la persistencia

6.4.1.- Evolución de la virulencia de los virus R

Es un hecho observado y apoyado por modelos teóricos que la coevolución virus-hospedador favorece, generalmente, una disminución de la virulencia viral, siendo

un ejemplo clásico el de myxomavirus y la myxomatosis en conejos (Fenner y Woodroffe 1965).

La constancia de las células BHK-21 en pases citolíticos seriados (Materiales y Métodos, sección 4.3.1.) contrasta con su variación en el sistema de persistencia del VFA, en el que las células coevolucionan con el virus residente, el cual aumenta su virulencia con el tiempo de residencia en las células (de la Torre y cols. 1988) (Introducción, sección 2.6.2.; Resultados, sección 5.7.). La hipervirulencia observada implica que el virus completa el ciclo de infección más rápidamente, con un incremento en la muerte celular (de la Torre y cols. 1988; Martín-Hernández y cols. 1994; Sevilla y Domingo 1996; Saíz y Domingo 1996). Cualquier revertiente o mutante que tardara más en completar el ciclo de infección mostraría una desventaja selectiva respecto al parental hipervirulento y sería eliminado de los mutantes de la cuasiespecie en competición. Ello explicaría la estabilidad del carácter hipervirulento incluso cuando los virus persistentes son propagados en infecciones citolíticas (Sevilla y Domingo 1996).

6.4.2.- Evolución de la capacidad replicativa (“fitness”) de los virus R

El “fitness” del virus residente de las células R del pase 100 de la primera infección persistente establecida en el laboratorio (virus VR100) muestra un incremento de 3,4 veces respecto al del virus parental C-S8c1 (Resultados, sección 5.8.). Al igual que la hipervirulencia de los virus persistentes, el ligero aumento de “fitness” parece asociado al incremento de resistencia celular a la infección durante el proceso de coevolución (de la Torre y cols. 1988).

Este ligero incremento de “fitness” del VR100, medido en células BHK-21, se corresponde con una menor producción de virus, disminución de moléculas de RNA intracelulares y extracelulares, fenotipo de placa pequeña y un gran incremento de virulencia en células BHK-21 (1000 veces más virulento que C-S8c1) (Introducción, secciones 2.6.1. y 2.6.2.).

Las características fenotípicas observadas en el VR100 recuerdan las mostradas por el clon de VFA H⁵₉₅, un clon derivado de la población C-S8p113 y que fue sometido a 95 pases placa a placa (Introducción, Figura 2.5.; Materiales y Métodos, sección 4.2.1.). H⁵₉₅ muestra una virulencia 35 veces superior a C-S8c1 pero un “fitness” 9 veces inferior (Resultados, sección 5.15.). Otros VFAs analizados muestran una correlación positiva entre sus valores de “fitness” y virulencia. Por ejemplo,

MARLS y C-S8p260p3d presentan unos valores de “fitness” relativos de 25 y 20, respectivamente, que se corresponden con unos valores de virulencia relativos de 3917 y 1284, respectivamente (Resultados, sección 5.15.) (Tabla 6.1.).

Tabla 6.1. Relación entre “fitness” y virulencia relativos de VFAs (descritos en Materiales y Métodos, sección 4.2.1.).

Virus	“Fitness” relativo	Virulencia relativa
VR100	3,4	1000
H ⁵ ₉₅	0,11	35
MARLS	25	3917
C-S8p260p3d	20	1284

6.5.- Relación entre virulencia y capacidad replicativa (“fitness”)

La relación de un patógeno con su hospedador presenta una paradoja: las especies patogénicas a menudo son absolutamente dependientes de las especies hospedadoras para su propagación, y como parte de esta dependencia el patógeno suele causar daño o enfermedad en el hospedador. Las estrategias patogénicas tienen éxito en términos evolutivos, como lo demuestra la existencia de una extensa colección de diferentes patógenos en la naturaleza. Los patógenos explotan un amplio rango de mecanismos moleculares para adquirir y modular su virulencia con el fin de alcanzar su éxito evolutivo (Brown y cols. 2006).

Un factor importante para modular la virulencia de un patógeno es el modo de transmisión. En la transmisión vertical los patógenos deben evolucionar hacia una menor virulencia, permitiendo un mayor éxito de su hospedador. Un estudio con el virus el virus del mosaico de la cebada (BSMV) mostró que, en la transmisión vertical, el virus evoluciona hacia una menor virulencia, mientras que en la transmisión horizontal lo hace hacia una mayor virulencia (Stewart y cols. 2005).

Un incremento paralelo de virulencia y “fitness” (Introducción, sección 2.1.3.) de un virus mejoraría su adaptación a un determinado tipo celular del hospedador, ya que un parámetro que contribuye al nivel de “fitness” de un virus citopático es la acumulación de partículas infecciosas y su liberación desde las células, que a menudo

está asociada con la muerte celular. De acuerdo con ello, una comparación de dos aislados genéticamente divergentes del whispovirus del síndrome de las manchas blancas, mostró que su virulencia para el hospedador *Penaeus monodon*, medida como índice de mortalidad *in vivo*, correlacionaba con el “fitness” *in vivo* (Marks y cols. 2005). En replicones de alfavirus también se observó una correlación directa entre el nivel de replicación del RNA y la citopatogenicidad (Frolov y cols. 1999). Un estudio con un mutante de alta fidelidad de poliovirus mostró que su “fitness” y su virulencia disminuían respecto al virus “wild-type” bajo presión selectiva en ratones (Pfeiffer y Kirkegaard 2005). El mutante de alta fidelidad era menos patogénico que el virus “wild-type” en ratones (mostrando sólo un ligero defecto de crecimiento en células en cultivo), y reducía el “fitness” viral en el contexto de una presión selectiva definida (una mutación puntual atenuante, que puede revertir, en la región codificante de la proteína 2C).

A nivel epidemiológico, el mayor “fitness” de los primeros aislados de VIH-1 (años 1986-1989) frente a aislados actuales (años 2002-2003) es una evidencia de la atenuación del VIH-1 con el tiempo, asumiendo una conexión directa entre “fitness” y virulencia (Arien y cols. 2005). El “fitness” replicativo es, sin embargo, solamente uno de varios factores que influyen en la progresión de una infección viral *in vivo*. Un análisis comparativo de clones de VIH-1 R5-trópicos y X4-trópicos mostró una capacidad replicativa similar en células T activadas. Sin embargo, los clones X4 eran transferidos más eficientemente que los R5 desde células dendríticas a células T CD4(+), lo cual puede suponer una ventaja selectiva de los virus X4 en pacientes con SIDA (Arien y cols. 2006). Variaciones de esta correlación entre “fitness” viral y virulencia han sido descritas en el virus del mosaico del pepino (CMV) (Escriu y cols. 2003) y el virus del mosaico de la cebada (BSMV) (Stewart y cols. 2005). Un estudio del efecto del tiempo de lisis en el “fitness” de un bacteriófago reveló que un linaje con un tiempo de lisis intermedio mostraba el mayor nivel de “fitness” (Wang 2006). El tiempo de transmisión del virus de un hospedador infectado a otro susceptible también puede afectar a la virulencia. El virus de la polihedrosis nuclear transmitido a tiempos tempranos a su hospedador *Lymantria dispar* era más virulento que el virus transmitido a tiempos tardíos, aunque éste era más productivo, ya que el virus puede emplear más tejido del hospedador para la replicación (Cooper y cols. 2002). La pérdida de correlación entre virulencia y “fitness” también ha sido descrita para la interacción de otros hospedadores con sus parásitos celulares. En un estudio de susceptibilidad de crías

de la polilla *Lymantria* (provenientes de América del Norte o no provenientes de América del Norte) a varios aislados del hongo *Entomophaga maimaiga*, la virulencia del hongo, cuantificada como tiempo de muerte de *Lymantria*, iba acompañada, en algunos casos, de bajo “fitness”, cuantificado como reproducción del hongo en la polilla (Nielsen y cols. 2005). En ninguno de los casos anteriores se han determinado las bases moleculares de la falta de correlación entre “fitness” y virulencia.

6.5.1.- Los determinantes de virulencia de VFA en BHK-21 son multigénicos

Al menos, tres determinantes de virulencia en células de cultivo o en animales han sido definidos en estudios previos con poblaciones naturales y de laboratorio de VFA (Introducción, sección 2.7.2.): la cápsida viral (Baranowski y cols. 1998; Jackson y cols. 1996; Ruiz-Jarabo y cols. 2004), la proteína no estructural 3A (Beard y Mason 2000; Giraudo y cols. 1990; Núñez y cols. 2001) y el IRES (Martínez-Salas y cols. 1993).

Diversos trabajos han identificado diferentes proteínas virales como determinantes de virulencia: las proteínas no estructurales 2B, 2C y 3A de rinovirus (Harris y Racaniello 2003, 2005), la proteína viral 24 (VP24) y la nucleoproteína del virus Ébola (Ebihara y cols. 2006), las tres glicoproteínas de la cápsida del virus de la fiebre porcina clásica (CSFV) (Meyers y cols. 1999; Rissatti y cols. 2005, 2006; van Gennip y cols. 2004), la proteína P3 del virus del mosaico de la semilla del guisante (Hjulsager y cols. 2006), etc. En general, los determinantes de virulencia son multigénicos, existiendo mutaciones en diversas regiones del genoma que contribuyen a un incremento de virulencia (Baranowski y cols. 1998; Ebihara y cols. 2006).

Medidas comparativas de virulencia, de quimeras recombinantes que incorporan regiones genómicas del clon H⁵₉₅ en el contexto genético de C-S8c1 (en el plásmido pMT28) y mutantes de la proteína 2C, muestran que los determinantes de virulencia de VFA en células BHK-21 son multigénicos y las sustituciones en la proteína no estructural 2C contribuyen a la elevada virulencia de los virus analizados (Resultados, secciones 5.16.3, 5.17. y 5.18.). Los resultados obtenidos con los mutantes de la proteína 2C fueron corroborados mediante otro abordaje consistente en las frecuencias de células supervivientes en el proceso del establecimiento de una infección persistente en células BHK-21 (Resultados, sección 5.19.).

6.5.2.- Modelo para la pérdida de correlación entre virulencia y “fitness”

Los resultados obtenidos con clones H⁵ del VFA muestran que mutaciones que incrementan tanto la virulencia como el “fitness” pueden ser introducidas en el genoma viral de tal modo que las mutaciones que disminuyen el “fitness”, asociadas a los pases placa a placa, tienen efectos mínimos en virulencia (Resultados, sección 5.15.). La cuantificación de la virulencia de genomas recombinantes (Resultados, secciones 5.16.3., 5.17. y 5.18.) proporciona una interpretación de la pérdida de correlación positiva entre virulencia y “fitness”, y muestra que la variación independiente de estas dos características es resultado de la historia de pases a la que han sido sometidas las poblaciones virales.

Durante los pases placa a placa aparecen mutaciones asociadas a una reducción del “fitness” distribuidas a lo largo de todo el genoma del VFA (Escarmís y cols. 1996). En cambio, los determinantes de virulencia son multigénicos pero se encuentran concentrados principalmente en determinadas regiones genómicas, en particular la cápsida viral y las proteínas no estructurales 2A, 2B, 2C y 3A. Para disminuir la virulencia, las mutaciones que aparecen aleatoriamente durante los pases placa a placa deberían afectar a dichas regiones genómicas específicas y, probablemente, a ciertos residuos dentro de estas regiones. En cambio, las mutaciones que implican una reducción del “fitness” pueden afectar a cualquier proteína y región regulatoria. Por tanto, la probabilidad de fijación de mutaciones que reducen la virulencia es menor que la probabilidad de fijación de mutaciones que reducen el “fitness”. Este modelo está reforzado por la observación de tres cambios de aminoácido en la proteína 2C (S 80 N, T 256 A y Q 263 H) que tienen un efecto similar, de forma individual, en el incremento de virulencia del VFA en células BHK-21, y a su vez, similar al efecto de las tres mutaciones juntas en el mismo genoma (Resultados, sección 5.17.). Esto sugiere que sería necesaria una reversión triple, para suprimir el efecto de incremento de virulencia provocado por las tres mutaciones en la proteína 2C, lo cual es muy poco probable que ocurra. Es decir, el genoma de VFA es más robusto respecto al mantenimiento de niveles de virulencia que de “fitness” y las diferentes trayectorias de ambos parámetros se deben al régimen de pases al que fue sometido el virus (Figura 6.1.).

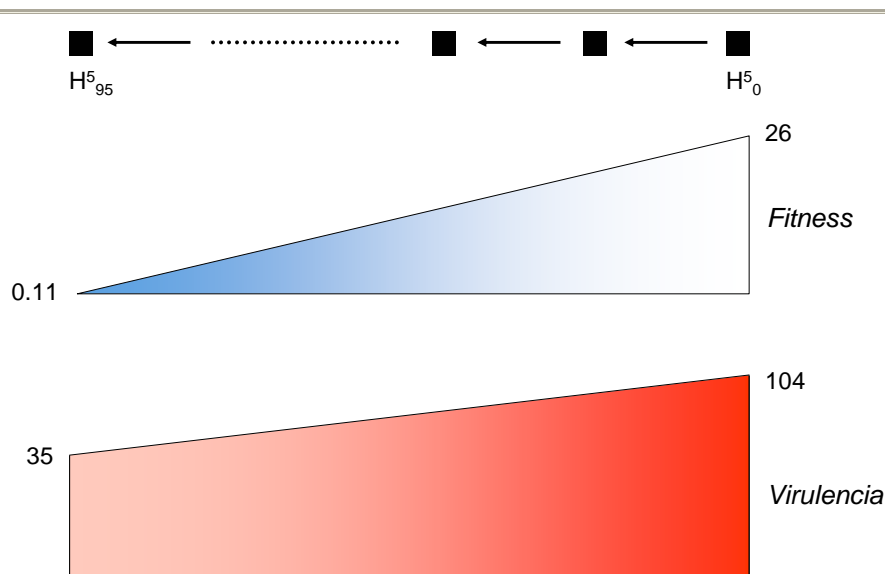


Figura 6.1. Evolución del “fitness” y la virulencia de clones de la serie H⁵. Los clones biológicos están representados como cuadrados negros. Las flechas negras indican pases placa a placa. La evolución del “fitness” y la virulencia durante 95 pases placa a placa se representa en azul y rojo, respectivamente.

6.6.- Implicaciones para modelos de virulencia y diseño de vacunas

Los resultados obtenidos con clones H⁵ del VFA son relevantes para modelos actuales de atenuación y virulencia, ya que indican que formas más virulentas de un virus no implican necesariamente una ventaja reproductiva. La virulencia viral, por tanto, no es necesariamente una consecuencia del “fitness” viral.

La mayoría de las definiciones actuales de virulencia se refieren, generalmente, a la capacidad de un patógeno para multiplicarse y causar daño en el hospedador, aunque algunos autores identifican virulencia con “fitness”, y otros con capacidad para producir enfermedad (Casadevall y Pirofski 1999; de Roode y cols. 2005; Poulin y Combes 1999; Read y cols. 1999).

Nuestros resultados sugieren que mientras la virulencia puede ser considerada como una consecuencia inevitable de la adaptación del parásito (Read y cols. 1999), la pérdida de “fitness” (o inadaptación del parásito) no requiere una disminución de virulencia. Al relacionar nuestros resultados con modelos generales de virulencia en sistemas hospedador-parásito, es necesario considerar que en el sistema del VFA, la evolución de las células hospedadoras BHK-21 no puede influir en la evolución del VFA, ya que las poblaciones celulares clonales mantienen el mismo nivel de

permissividad a la replicación del VFA. El número e historia de pases de las células BHK-21 es constante en cada infección viral. Por tanto, los cambios en la densidad de hospedador, un parámetro relevante en modelos de virulencia (Lenski y May 1994), no puede jugar un papel determinante en nuestro sistema. El descubrimiento en experimentos de pases seriados de que la virulencia de un parásito se incrementa con el número de pase en un nuevo hospedador es consistente con nuestros resultados (Ebert 1998).

Nuestra comparación, en cuanto a “fitness” y virulencia, de clones del VFA no ha identificado clones con alto “fitness” y baja virulencia, lo cual es una meta de la biomedicina para obtener cepas vacunales. No obstante, la existencia de mutaciones específicas que afectan diferencialmente al “fitness” y la virulencia abre una vía para el diseño de cepas candidatas para vacunas incapaces de matar al hospedador pero que sean competentes en replicación. La virulencia es, sin embargo, una característica de la relación hospedador-parásito (Poulin y Combes 1999) y las mutaciones necesarias para alterar la virulencia se espera que sean dependientes del hospedador. En realidad, tanto el “fitness” como la virulencia son dependientes del ambiente en el cual tiene lugar la replicación, como documentan trabajos con diferentes virus, incluyendo el VFA (Díez y cols. 1990; Pariente y cols. 2001).

La demostración de que el “fitness” y la virulencia pueden seguir diferentes cursos evolutivos ha sido posible por disponer de un sistema vírico sometido a presiones ambientales extremas mediadas por la historia de pases en las mismas células hospedadoras: la evolución competitiva de un amplio espectro de mutantes durante repetidos pases masivos y la acumulación de mutaciones deletéreas (en cuanto a “fitness” pero no en cuanto a virulencia) durante pases placa a placa (Escarmís y cols. 2006).

El proceso de selección y evolución de la virulencia es continuo, y está influenciado por eventos tanto deterministas como estocásticos. Sin embargo, la evolución de los hospedadores y los patógenos correspondientes están inexorablemente ligadas. La comprensión de las bases moleculares de la adaptación de los patógenos a sus hospedadores probablemente conduzca a la identificación de los determinantes genéticos de virulencia del patógeno y a la clarificación del papel de proteínas específicas en el proceso patogénico. El conocimiento molecular más detallado de la virulencia del patógeno y la respuesta del hospedador tiene implicaciones para la salud humana, y será crucial para perfeccionar el control de las infecciones en el futuro.

Conclusiones

7.- Conclusiones

1. En las líneas RB y RD de células BHK-21 persistentemente infectadas con C-S8c1 se repiten pautas de evolución definidas anteriormente en este sistema, que incluyen modificaciones genéticas y fenotípicas de virus y células, así como la coevolución virus - célula.
2. Durante la persistencia del VFA se puede alterar la relación entre moléculas de RNA viral de cadena positiva y cadena negativa. En infecciones citolíticas estándar de células BHK-21 por VFA dicha relación es 1000:1, mientras que en las líneas RB y RD persistentemente infectadas con C-S8c1 la relación puede alcanzar 1:1 o, incluso, 1:100. Tanto los virus como las células participan en la alteración del nivel de moléculas de RNA de polaridad negativa relativo al de RNA de polaridad positiva durante la persistencia.
3. En un clon biológico del VFA se ha observado una ausencia de correlación positiva entre “fitness” y virulencia, medidos ambos en el mismo ambiente biológico de células BHK-21. Las diferentes trayectorias evolutivas seguidas por “fitness” y virulencia fueron resultado de la historia de pases a la que se sometieron las poblaciones virales.
4. Los determinantes de virulencia de VFA en células BHK-21 son multigénicos y sustituciones en la proteína no estructural 2C contribuyen a alterar la virulencia del VFA.
5. Hemos propuesto un modelo para la ausencia de correlación positiva entre “fitness” y virulencia del VFA en células BHK-21: mientras que los determinantes de “fitness” se distribuyen a lo largo de todo el genoma del VFA, los determinantes de virulencia son multigénicos pero están localizados en algunas zonas concretas del genoma. Por tanto, el fenotipo virulencia es más robusto que el fenotipo “fitness” frente a la perturbación producida por la acumulación de mutaciones.

Bibliografía

8.- Bibliografía

- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., and Brown, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**(6209), 709-716.
- Ahmed, R., Canning, W. M., Kauffman, R. S., Sharpe, A. H., Hallum, J. V., and Fields, B. N. (1981). Role of the host cell in persistent viral infection: coevolution of L cells and reovirus during persistent infection. *Cell* **25**(2), 325-332.
- Ahmed, R., Hahn, C. S., Somasundaram, T., Villarete, L., Matloubian, M., and Strauss, J. H. (1991). Molecular basis of organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *J Virol* **65**(8), 4242-7.
- Ahmed, R., and Chen I. S. Y. (1999). Persistent viral infections. John Wiley and Sons. Chichester, UK.
- Airaksinen, A., Pariente, N., Menendez-Arias, L., and Domingo, E. (2003). Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* **311**(2), 339-49.
- Albiach-Marti, M. R., Mawassi, M., Gowda, S., Satyanarayana, T., Hilf, M. E., Shanker, S., Almira, E. C., Vives, M. C., Lopez, C., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P., Garnsey, S. M., and Dawson, W. O. (2000). Sequences of *Citrus Tristeza Virus* separated in time and space are essentially identical. *J Virol* **74**(15), 6856-65.
- Andreoletti, L., Hober, D., Becquart, P., Belaich, S., Copin, M. C., Lambert, V., and Watre, P. (1997). Experimental CVB3-induced chronic myocarditis in two murine strains: evidence of interrelationships between virus replication and myocardial damage in persistent cardiac infection. *J Med Virol* **52**(2), 206-14.
- Argos, P., Kamer, G., Nicklin, M. J., and Wimmer, E. (1984). Similarity in gene organization and homology between proteins of animal picornaviruses and a plant comovirus suggest common ancestry of these virus families. *Nucleic Acids Res* **12**(18), 7251-67.
- Arias, A., Lazaro, E., Escarmis, C., and Domingo, E. (2001). Molecular intermediates of fitness gain of an RNA virus: characterization of a mutant spectrum by biological and molecular cloning. *J Gen Virol* **82**(Pt 5), 1049-60.
- Arias, A., Ruiz-Jarabo, C. M., Escarmis, C., and Domingo, E. (2004). Fitness increase of memory genomes in a viral quasispecies. *J Mol Biol* **339**(2), 405-12.
- Arien, K. K., Troyer, R. M., Gali, Y., Colebunders, R. L., Arts, E. J., and Vanham, G. (2005). Replicative fitness of historical and recent HIV-1 isolates suggests HIV-1 attenuation over time. *Aids* **19**(15), 1555-64.

- Arien, K. K., Gali, Y., El-Abdellati, A., Heyndrickx, L., Janssens, W., and Vanham, G. (2006). Replicative fitness of CCR5-using and CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 biological clones. *Virology* **347**(1), 65-74.
- Bae, Y. S., and Yoon, J. W. (1993). Determination of diabetogenicity attributable to a single amino acid, Ala776, on the polyprotein of encephalomyocarditis virus. *Diabetes* **42**(3), 435-43.
- Baginski, S. G., Pevear, D. C., Seipel, M., Sun, S. C., Benetatos, C. A., Chunduru, S. K., Rice, C. M., and Collett, M. S. (2000). Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14), 7981-6.
- Baranowski, E., Sevilla, N., Verdaguer, N., Ruíz-Jarabo, C. M., Beck, E., and Domingo, E. (1998). Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **72**(8), 6362-6372.
- Baranowski, E., Ruíz-Jarabo, C. M., Sevilla, N., Andreu, D., Beck, E., and Domingo, E. (2000). Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol* **74**(4), 1641-7.
- Baranowski, E., Ruíz-Jarabo, C. M., and Domingo, E. (2001a). Evolution of cell recognition by viruses. *Science* **292**, 1102-1105.
- Baranowski, E., Ruíz-Jarabo, C. M., Lim, F., and Domingo, E. (2001b). Foot-and-Mouth Disease Virus Lacking the VP1 G-H Loop: The Mutant Spectrum Uncovers Interactions among Antigenic Sites for Fitness Gain. *Virology* **288**(2), 192-202.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Pariente, N., Verdaguer, N., and Domingo, E. (2003). Evolution of cell recognition by viruses: a source of biological novelty with medical implications. *Adv Virus Res* **62**, 19-111.
- Baron, S. (1996). Medical Microbiology. University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas.
- Barreca, C., and O'Hare, P. (2006). Characterization of a potent refractory state and persistence of herpes simplex virus 1 in cell culture. *J Virol* **80**(18), 9171-80.
- Barteling, S. J., and Woortmeyer, R. (1987). Multiple variants in foot-and-mouth disease virus (FMDV) populations: the Achilles heel for peptide and rec. DNA vaccines? *Dev Biol Stand* **66**, 511-21.
- Bastos, A. D., Boshoff, C. I., Keet, D. F., Bengis, R. G., and Thomson, G. R. (2000). Natural transmission of foot-and-mouth disease virus between African buffalo (*Syncerus caffer*) and impala (*Aepyceros melampus*) in the Kruger National Park, South Africa. *Epidemiol Infect* **124**(3), 591-8.

- Batschelet, E., Domingo, E., and Weissmann, C. (1976). The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene* **1**(1), 27-32.
- Beard, C. W., and Mason, P. W. (2000). Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **74**(2), 987-91.
- Belsham, G. J. (1993). Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog Biophys Mol Biol* **60**(3), 241-260.
- Belsham, G. J., and Sonenberg, N. (1996). RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiol Rev* **60**(3), 499-511.
- Belsham, G. J., and Sonenberg, N. (2000). Picornavirus RNA translation: roles for cellular proteins. *Trends Microbiol* **8**(7), 330-5.
- Belsham, G. J., McInerney, G. M., and Ross-Smith, N. (2000). Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J Virol* **74**(1), 272-80.
- Berger, E. A., Murphy, P. M., and Farber, J. M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**, 657-700.
- Berinstein, A., Roivainen, M., Hovi, T., Mason, P. W., and Baxt, B. (1995). Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha_v \beta_3$) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J Virol* **69**(4), 2664-2666.
- Biebricher, C. K., and Eigen, M. (2006). What is a quasispecies? *Curr Top Microbiol Immunol* **299**, 1-31.
- Bienz, K., Egger, D., and Pasamontes, L. (1987). Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* **160**(1), 220-6.
- Bienz, K., Egger, D., Troxler, M., and Pasamontes, L. (1990). Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol* **64**(3), 1156-63.
- Bjorndal, A., Deng, H., Jansson, M., Fiore, J. R., Colognesi, C., Karlsson, A., Albert, J., Scarlatti, G., Littman, D. R., and Fenyo, E. M. (1997). Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* **71**(10), 7478-87.
- Blick, T. J., Tiong, T., Sahasrabudhe, A., Varghese, J. N., Colman, P. M., Hart, G. J., Bethell, R. C., and McKimm-Breschkin, J. L. (1995). Generation and characterization of an influenza virus neuraminidase variant with decreased

- sensitivity to the neuraminidase-specific inhibitor 4-guanidino-Neu5Ac2en. *Virology* **214**(2), 475-84.
- Boerner, J. E., Lyle, J. M., Daijogo, S., Semler, B. L., Schultz, S. C., Kirkegaard, K., and Richards, O. C. (2005). Allosteric effects of ligands and mutations on poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **79**(12), 7803-11.
- Borrego, B., Novella, I. S., Giralt, E., Andreu, D., and Domingo, E. (1993). Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. *J Virol* **67**(10), 6071-6079.
- Borrego, B., Camarero, J. A., Mateu, M. G., and Domingo, E. (1995). A highly divergent antigenic site of foot-and-mouth disease virus retains its immunodominance. *Viral Immunol* **8**(1), 11-18.
- Borrow, P., Evans, C. F., and Oldstone, M. B. (1995). Virus-induced immunosuppression: immune system-mediated destruction of virus-infected dendritic cells results in generalized immune suppression. *J Virol* **69**(2), 1059-70.
- Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Pfeffer, N., Meyers, H., Nelson, J. A., Gairin, J. E., Hahn, B. H., Oldstone, M. B., and Shaw, G. M. (1997). Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature Medicine* **3**(2), 205-211.
- Both, G. W., Shi, C. H., and Kilbourne, E. D. (1983). Hemagglutinin of swine influenza virus: a single amino acid change pleiotropically affects viral antigenicity and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(22), 6996-7000.
- Bowen, D. G., and Walker, C. M. (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* **436**(7053), 946-52.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F. A. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23), 13034-9.
- Broliden, P. A., Makitalo, B., Akerblom, L., Rosen, J., Broliden, K., Utter, G., Jondal, M., Norrby, E., and Wahren, B. (1991). Identification of amino acids in the V3 region of gp120 critical for virus neutralization by human HIV-1-specific antibodies. *Immunology* **73**(4), 371-6.
- Brown, N. F., Wickham, M. E., Coombes, B. K., and Finlay, B. B. (2006). Crossing the line: selection and evolution of virulence traits. *PLoS Pathog* **2**(5), e42.
- Burgert, H. G., Ruzsics, Z., Obermeier, S., Hilgendorf, A., Windheim, M., and Elsing, A. (2002). Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **269**, 273-318.

- Calvez, V., Pelletier, I., Couderc, T., Pavio-Guedo, N., Blondel, B., and Colbere-Garapin, F. (1995). Cell clones cured of persistent poliovirus infection display selective permissivity to the wild-type poliovirus strain Mahoney and partial resistance to the attenuated Sabin 1 strain and Mahoney mutants. *Virology* **212**(2), 309-322.
- Cao, W., Henry, M. D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J. H., Ravkov, E. V., Nichol, S. T., Compans, R. W., Campbell, K. P., and Oldstone, M. B. (1998). Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**(5396), 2079-81.
- Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J., and Ho, D. D. (1995). Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **332**(4), 201-208.
- Carman, W. F., Zanetti, A. R., Karayiannis, P., Waters, J., Manzillo, G., Tanzi, E., Zuckerman, A. J., and Thomas, H. C. (1990). Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* **336**(8711), 325-9.
- Carman, W., Thomas, H., and Domingo, E. (1993). Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. *Lancet* **341**(8841), 349-353.
- Carrillo, C., Tulman, E. R., Delhon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G. F., and Rock, D. L. (2005). Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **79**(10), 6487-504.
- Casadevall, A., and Pirofski, L. A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* **67**(8), 3703-13.
- Chao, L. (1990). Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* **348**(6300), 454-455.
- Charini, A., Arista, S., Giammanco, A., and Sinatra, A. (1983). Rotavirus persistence in cell cultures: selection of resistant cells in the presence of fetal calf serum. *J Gen Virol* **64**(Pt 5), 1101-1110.
- Charpentier, N., Dávila, M., Domingo, E., and Escarmís, C. (1996). Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. *Virology* **223**(1), 10-18.
- Chen, W., and Baric, R. S. (1996). Molecular anatomy of mouse hepatitis virus persistence: coevolution of increased host cell resistance and virus virulence. *J Virol* **70**(6), 3947-3960.
- Chen, T., and Hudnall, S. D. (2006). Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. *Mod Pathol* **19**(5), 726-37.
- Ciurea, A., Klenerman, P., Hunziker, L., Horvath, E., Senn, B. M., Ochsenbein, A. F., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (2000). Viral persistence *in vivo* through

- selection of neutralizing antibody- escape variants. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(6), 2749-54.
- Clarke, D. K., Duarte, E. A., Moya, A., Elena, S. F., Domingo, E., and Holland, J. (1993). Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. *J Virol* **67**(1), 222-228.
- Coffin, J. M. (1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**(5197), 483-9.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E. (1997). Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Colbère-Garapin, F., Christodoulou, C., Crainic, R., and Pelletier, I. (1989). Persistent poliovirus infection of human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(19), 7590-4.
- Cooper, V. S., Reiskind, M. H., Miller, J. A., Shelton, K. A., Walther, B. A., Elkinton, J. S., and Ewald, P. W. (2002). Timing of transmission and the evolution of virulence of an insect virus. *Proc Biol Sci* **269**(1496), 1161-5.
- Costa Gioni, M. P., Bergmann, I. E., Scodeller, E. A., Auge de Mello, P., Gomez, I., and La Torre, J. L. (1984). Heterogeneity of the polyribocytidylic acid tract in aphthovirus: biochemical and biological studies of viruses carrying polyribocytidylic acid tracts of different lengths. *J Virol* **51**(3), 799-805.
- Crotty, S., Maag, D., Arnold, J. J., Zhong, W., Lau, J. Y. N., Hong, Z., Andino, R., and Cameron, C. E. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleotide, ribavirin, is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine* **6**, 1375-1379.
- Cummings, P. J., and Rinaldo, C. R., Jr. (1989). Coevolution of virulent virus and resistant cells as a mechanism of persistence of herpes simplex virus type 1 in a human T lymphoblastoid cell line. *J Gen Virol* **70** (Pt 1), 97-106.
- Cunningham, L., Bowles, N. E., Lane, R. J., Dubowitz, V., and Archard, L. C. (1990). Persistence of enteroviral RNA in chronic fatigue syndrome is associated with the abnormal production of equal amounts of positive and negative strands of enteroviral RNA. *J Gen Virol* **71** (Pt 6), 1399-402.
- Curry, S., Fry, E., Blakemore, W., Abu-Ghazaleh, R., Jackson, T., King, A., Lea, S., Newman, J., Rowlands, D., and Stuart, D. (1996). Perturbations in the surface structure of A22 Iraq foot-and-mouth disease virus accompanying coupled changes in host cell specificity and antigenicity. *Structure* **4**(2), 135-145.
- Dawe, P. S., Flanagan, F. O., Madekurozwa, R. L., Sorensen, K. J., Anderson, E. C., Foggin, C. M., Ferris, N. P., and Knowles, N. J. (1994). Natural transmission of foot-and-mouth disease virus from African buffalo (*Syncerus caffer*) to cattle in a wildlife area of Zimbabwe. *Vet Rec* **134**(10), 230-2.

- De Jong, J. J., De Ronde, A., Keulen, W., Tersmette, M., and Goudsmit, J. (1992). Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* **66**(11), 6777-80.
- de la Torre, J. C., Dávila, M., Sobrino, F., Ortín, J., and Domingo, E. (1985). Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology* **145**(1), 24-35.
- de la Torre, J. C., Alarcón, B., Martínez-Salas, E., Carrasco, L., and Domingo, E. (1987). Ribavirin cures cells of a persistent infection with foot-and-mouth disease virus *in vitro*. *J Virol* **61**(1), 233-235.
- de la Torre, J. C., and Domingo, E. (1988). Minimum number of cells required for reconstitution of a foot-and-mouth disease virus-carrier cell culture. *Microbiologia* **4**(3), 161-166.
- de la Torre, J. C., Martínez-Salas, E., Díez, J., Villaverde, A., Gebauer, F., Rocha, E., Dávila, M., and Domingo, E. (1988). Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **62**(6), 2050-2058.
- de la Torre, J. C., de la Luna, S., Díez, J., and Domingo, E. (1989a). Resistance to foot-and-mouth disease virus mediated by trans-acting cellular products. *J Virol* **63**(5), 2385-2387.
- de la Torre, J. C., Martínez-Salas, E., Díez, J., and Domingo, E. (1989b). Extensive cell heterogeneity during persistent infection with foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **63**(1), 59-63.
- de la Torre, J. C., and Holland, J. J. (1990). RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *J Virol* **64**(12), 6278-81.
- de la Torre, J. C., Wimmer, E., and Holland, J. J. (1990). Very high frequency of reversion to guanidine resistance in clonal pools of guanidine-dependent type 1 poliovirus. *J Virol* **64**(2), 664-71.
- Delli Bovi, P., De Simone, V., Giordano, R., and Amati, P. (1984). Polyomavirus growth and persistence in Friend erythroleukemic cells. *J Virol* **49**(2), 566-71.
- de Roode, J. C., Pansini, R., Cheesman, S. J., Helinski, M. E., Huijben, S., Wargo, A. R., Bell, A. S., Chan, B. H., Walliker, D., and Read, A. F. (2005). Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(21), 7624-8.
- Devaney, M. A., Vakharia, V. N., Lloyd, R. E., Ehrenfeld, E., and Grubman, M. J. (1988). Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J Virol* **62**(11), 4407-9.

- Díez, J., Mateu, M. G., and Domingo, E. (1989). Selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an in situ assay. *J Gen Virol* **70**, 3281-3289.
- Díez, J., Dávila, M., Escarmís, C., Mateu, M. G., Dominguez, J., Pérez, J. J., Giralt, E., Melero, J. A., and Domingo, E. (1990). Unique amino acid substitutions in the capsid proteins of foot-and-mouth disease virus from a persistent infection in cell culture. *J Virol* **64**(11), 5519-5528.
- Doedens, J. R., and Kirkegaard, K. (1995). Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *Embo J* **14**(5), 894-907.
- Domingo, E., Sabo, D., Taniguchi, T., and Weissmann, C. (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* **13**(4), 735-744.
- Domingo, E., Dávila, M., and Ortín, J. (1980). Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* **11**(3-4), 333-346.
- Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortín, J., López-Galindez, C., Pérez-Breña, P., Villanueva, N., Nájera, R., VandePol, S., Steinhauer, D. A., DePolo, N. J., and Holland, J. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene* **40**(1), 1-8.
- Domingo, E., and Holland, J. (1988). High error rates, population equilibrium and evolution of RNA replication systems. In "RNA Genetics" (E. Domingo, P. Ahlquist, and J. Holland, Eds.), Vol. III, pp. 4-36. CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida.
- Domingo, E. (1989). RNA virus evolution and the control of viral disease. *Prog Drug Res* **33**, 93-133. Domingo, E., Escarmís, C., Martínez, M. A., Martínez-Salas, E., and Mateu, M. G. (1992). Foot-and-mouth disease virus populations are quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**, 33-47.
- Domingo, E., Mateu, M. G., Martínez, M. A., Dopazo, J., Moya, A., and Sobrino, F. (1990). Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In "Applied Virology Research" (E. Kurkstak, R. G. Marusyk, S. A. Murphy, and M. H. V. Van-Regenmortel, Eds.), Vol. II, pp. 233-266. Plenum Publishing Co., New York.
- Domingo, E., and Holland, J. J. (1992). Complications of RNA heterogeneity for the engineering of virus vaccines and antiviral agents. *Genet Eng (N Y)* **14**, 13-31.
- Domingo, E., and Holland, J. (1994). Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In "The evolutionary biology of viruses" (Morse SS, Ed). Raven Press, New York.
- Domingo, E., and Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* **51**, 151-178.

- Domingo, E., Menéndez-Arias, L., Quiñones-Mateu, M. E., Holguín, A., Gutiérrez-Rivas, M., Martínez, M. A., Quer, J., Novella, I. S., and Holland, J. J. (1997). Viral quasispecies and the problem of vaccine-escape and drug-resistant mutants. *Prog Drug Res* **48**, 99-128.
- Domingo, E., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Martín-Hernández, A. M., Sáiz, J. C., and Escarmís, C. (1998). Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg Infect Dis* **4**(4), 521-527.
- Domingo, E. (1999). RNA virus quasispecies as models of biological complexity. In "Proceedings 10th Anniversary Symposium. The Samuel Roberts Noble Foundation, Plant Biology Division" (R. A. Dixon, M. J. Harrison, and M. J. Roossinck, Eds.), pp. 79-90. The Samuel Roberts Foundation, Ardmore.
- Domingo, E., Escarmís, C., Menéndez-Arias, L., and Holland, J. J. (1999a). Viral quasispecies and fitness variations. In "Origin and Evolution of Viruses" (E. Domingo, R. G. Webster, and J. J. Holland, Eds.), pp. 141-161. Academic Press, San Diego.
- Domingo, E., Verdaguer, N., Ochoa, W. F., Ruiz-Jarabo, C. M., Sevilla, N., Baranowski, E., Mateu, M. G., and Fita, I. (1999b). Biochemical and structural studies with neutralizing antibodies raised against foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* **62**(2), 169-75.
- Domingo, E., Webster, R. G., and Holland, J. J. (1999c). Origin and Evolution of Viruses. Academic Press, San Diego.
- Domingo, E., Biebricher, C., Eigen, M., and Holland, J. J. (2001). "Quasispecies and RNA Virus Evolution: Principles and Consequences." Landes Bioscience, Austin, Texas.
- Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Carrillo, E., Nuñez, J. I., and Sobrino, F. (2003). Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* **91**(1), 47-63.
- Domingo, E. (2006). Quasispecies: Concepts and Implications for Virology. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**.
- Domingo, E., Martin, V., Perales, C., Grande-Perez, A., Garcia-Arriaza, J., and Arias, A. (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**, 51-82.
- Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(16), 7160-7164.
- Drake, J. W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(9), 4171-5.
- Drake, J. W., and Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 13910-13913.

- Duarte, E., Clarke, D., Moya, A., Domingo, E., and Holland, J. (1992). Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(13), 6015-6019.
- Duarte, E. A., Novella, I. S., Ledesma, S., Clarke, D. K., Moya, A., Elena, S. F., Domingo, E., and Holland, J. J. (1994a). Subclonal components of consensus fitness in an RNA virus clone. *J Virol* **68**(7), 4295-4301.
- Duarte, E. A., Novella, I. S., Weaver, S. C., Domingo, E., Wain-Hobson, S., Clarke, D. K., Moya, A., Elena, S. F., de la Torre, J. C., and Holland, J. J. (1994b). RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. *Infect Agents Dis* **3**(4), 201-214.
- Dulbecco, R., and Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyomavirus. *Virology* **8**, 396-401.
- Dunn, C. S., and Donaldson, A. I. (1997). Natural adaption to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus. *Vet Rec* **141**(7), 174-5.
- Ebert, D. (1998). Experimental evolution of parasites. *Science* **282**(5393), 1432-5.
- Ebihara, H., Takada, A., Kobasa, D., Jones, S., Neumann, G., Theriault, S., Bray, M., Feldmann, H., and Kawaoka, Y. (2006). Molecular determinants of Ebola virus virulence in mice. *PLoS Pathog* **2**(7), e73.
- Echols, H., and Goodman, M. F. (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem* **60**, 477-511.
- Eigen, M. (1971). Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**, 465-523.
- Eigen, M., and Schuster, P. (1979). The hypercycle. A principle of natural self-organization. Springer, Berlin.
- Eigen, M., and Biebricher, C. K. (1988). Sequence space and quasispecies distribution. In "RNA Genetics" (E. Domingo, P. Ahlquist, and J. J. Holland, Eds.), Vol. III, pp. 211-245. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Eigen, M., McCaskill, J., and Schuster, P. (1988). Molecular quasi-species. *J Phys Chem* **92**, 6881-6891.
- Eigen, M. (1993). Viral quasispecies. *Sci Am* **269**(1), 42-9.
- Eigen, M. (1996). On the nature of virus quasispecies. *Trends Microbiol* **4**(6), 216-218.
- Elena, S. F., González-Candelas, F., Novella, I. S., Duarte, E. A., Clarke, D. K., Domingo, E., Holland, J. J., and Moya, A. (1996). Evolution of fitness in experimental populations of vesicular stomatitis virus. *Genetics* **142**(3), 673-679.

- Escarmís, C., Toja, M., Medina, M., and Domingo, E. (1992). Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res* **26**(2), 113-125.
- Escarmís, C., Dopazo, J., Dávila, M., Palma, E. L., and Domingo, E. (1995). Large deletions in the 5'-untranslated region of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virus Res* **35**(2), 155-167.
- Escarmís, C., Dávila, M., Charpentier, N., Bracho, A., Moya, A., and Domingo, E. (1996). Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J Mol Biol* **264**, 255-267.
- Escarmís, C., Carrillo, E. C., Ferrer, M., Arriaza, J. F., Lopez, N., Tami, C., Verdaguer, N., Domingo, E., and Franze-Fernández, M. T. (1998). Rapid selection in modified BHK-21 cells of a foot-and-mouth disease virus variant showing alterations in cell tropism. *J Virol* **72**(12), 10171-10179.
- Escarmís, C., Dávila, M., and Domingo, E. (1999). Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet. *J Mol Biol* **285**, 495-505.
- Escarmis, C., Gomez-Mariano, G., Davila, M., Lazaro, E., and Domingo, E. (2002). Resistance to extinction of low fitness virus subjected to plaque-to-plaque transfers: diversification by mutation clustering. *J Mol Biol* **315**(4), 647-61.
- Escarmis, C., Lazaro, E., and Manrubia, S. C. (2006). Population bottlenecks in quasispecies dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**, 141-70.
- Escriu, F., Fraile, A., and Garcia-Arenal, F. (2003). The evolution of virulence in a plant virus. *Evolution Int J Org Evolution* **57**(4), 755-65.
- Falk, M. M., Sobrino, F., and Beck, E. (1992). VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **66**(4), 2251-60.
- Fenner, F., and Woodroffe, G. M. (1965). Changes in the Virulence and Antigenic Structure of Strains of Myoma Virus Recovered from Australian Wild Rabbits between 1950 and 1964. *Aust J Exp Biol Med Sci* **43**, 359-70.
- Ferguson, N. M., Donnelly, C. A., and Anderson, R. M. (2001). The foot-and-mouth epidemic in Great Britain: pattern of spread and impact of interventions. *Science* **292**(5519), 1155-60.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., and Verdaguer, N. (2004). Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J Biol Chem* **279**(45), 47212-21.

- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., and Verdaguer, N. (2006a). The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *Embo J* **25**(4), 880-8.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Escarmis, C., and Verdaguer, N. (2006b). A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* **16**(1), 27-34.
- Figlerowicz, M., Alejska, M., and Kurzynska-Kokorniak, A. (2003). Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med Res Rev* **23**(4), 488-518.
- Finke, S., and Conzelmann, K. K. (1997). Ambisense gene expression from recombinant rabies virus: random packaging of positive- and negative-strand ribonucleoprotein complexes into rabies virions. *J Virol* **71**(10), 7281-8.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Krug, R. M., Racaniello, V. R., and Skalka, A. M. (2004). Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses. ASM Press, Washington D.C.
- Formella, S., Jehle, C., Sauder, C., Staeheli, P., and Schwemmle, M. (2000). Sequence variability of Borna disease virus: resistance to superinfection may contribute to high genome stability in persistently infected cells. *J Virol* **74**(17), 7878-83.
- Forns, X., Purcell, R. H., and Bukh, J. (1999). Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends in Microbiol* **7**, 402-410.
- Fouchier, R. A., Groenink, M., Kootstra, N. A., Tersmette, M., Huisman, H. G., Miedema, F., and Schuitemaker, H. (1992). Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* **66**(5), 3183-7.
- Fox, G., Parry, N. R., Barnett, P. V., McGinn, B., Rowlands, D. J., and Brown, F. (1989). The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J Gen Virol* **70**, 625-637.
- Frolov, I., Agapov, E., Hoffman, T. A., Jr., Pragai, B. M., Lipka, M., Schlesinger, S., and Rice, C. M. (1999). Selection of RNA replicons capable of persistent noncytopathic replication in mammalian cells. *J Virol* **73**(5), 3854-65.
- Frolov, I., Hardy, R., and Rice, C. M. (2001). Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *Rna* **7**(11), 1638-51.
- Fry, E. E., Lea, S. M., Jackson, T., Newman, J. W., Ellard, F. M., Blakemore, W. E., Abu-Ghazaleh, R., Samuel, A., King, A. M., and Stuart, D. I. (1999). The structure and function of a foot-and-mouth disease virus- oligosaccharide receptor complex. *EMBO J* **18**(3), 543-54.

- Fujii, H., Moriyama, K., Sakamoto, N., Kondo, T., Yasuda, K., Hiraizumi, Y., Yamazaki, M., Sakaki, Y., Okochi, K., and Nakajima, E. (1992). Gly145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. *Biochem Biophys Res Commun* **184**(3), 1152-7.
- Furtado, M. R., Callaway, D. S., Phair, J. P., Kunstman, K. J., Stanton, J. L., Macken, C. A., Perelson, A. S., and Wolinsky, S. M. (1999). Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med* **340**(21), 1614-22.
- Futuyma, D. J., and Slatkin, M. (1983). *Coevolution*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, England.
- Garcia-Arriaza, J., Manrubia, S. C., Toja, M., Domingo, E., and Escarmis, C. (2004). Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J Virol* **78**(21), 11678-85.
- Garcia-Arriaza, J., Domingo, E., and Escarmis, C. (2005). A segmented form of foot-and-mouth disease virus interferes with standard virus: a link between interference and competitive fitness. *Virology* **335**(2), 155-64.
- Gebauer, F., de la Torre, J. C., Gomes, I., Mateu, M. G., Barahona, H., Tiraboschi, B., Bergmann, I., de Mello, P. A., and Domingo, E. (1988). Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J Virol* **62**(6), 2041-2049.
- Giles, J. (2001). Farmers act to avert foot-and-mouth crisis. *Nature* **410**(6824), 4.
- Giraud, A. T., Beck, E., Strebel, K., de Mello, P. A., La Torre, J. L., Scodeller, E. A., and Bergmann, I. E. (1990). Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology* **177**(2), 780-3.
- Glaser, W., and Skern, T. (2000). Extremely efficient cleavage of eIF4G by picornaviral proteinases L and 2A in vitro. *FEBS Lett* **480**(2-3), 151-5.
- Goodenow, M. M., Rose, S. L., Tuttle, D. L., and Sleasman, J. W. (2003). HIV-1 fitness and macrophages. *J Leukoc Biol* **74**(5), 657-66.
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Richardson, A., Meredith, J., Almond, J. W., Barclay, W., and Evans, D. J. (2000). Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J Virol* **74**(10), 4590-600.
- Goodman, S. (2001). Standards needed for foot-and-mouth tests. *Nature* **410**(6832), 1012.
- Gorman, O. T., Bean, W. J., and Webster, R. G. (1992). Evolutionary processes in influenza viruses: divergence, rapid evolution, and stasis. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**, 75-97.

- Gradi, A., Svitkin, Y. V., Imataka, H., and Sonenberg, N. (1998). Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19), 11089-94.
- Gradi, A., Foeger, N., Strong, R., Svitkin, Y. V., Sonenberg, N., Skern, T., and Belsham, G. J. (2004). Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII within foot-and-mouth disease virus-infected cells: identification of the L-protease cleavage site in vitro. *J Virol* **78**(7), 3271-8.
- Graff, J., Normann, A., Feinstone, S. M., and Flehmig, B. (1994). Nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus GBM in comparison with two cell culture-adapted variants. *J Virol* **68**(1), 548-54.
- Gromeier, M., Wimmer, E., and Gorbalenya, A. E. (1999). Genetics, pathogenesis and evolution of picornaviruses. In "Origin and Evolution of Viruses" (E. Domingo, R. G. Webster, and J. J. Holland, Eds.), pp. 287-343. Academic Press, San Diego.
- Guarné, A., Tormo, J., Kirchweiger, R., Pfistermueller, D., Fita, I., and Skern, T. (1998). Structure of the foot-and-mouth disease virus leader protease: a papain- like fold adapted for self-processing and eIF4G recognition. *Embo J* **17**(24), 7469-79.
- Hansen, J., Long, A. M., and Schultz, S. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **15**, 1109-1122.
- Harris, J. R., and Racaniello, V. R. (2003). Changes in rhinovirus protein 2C allow efficient replication in mouse cells. *J Virol* **77**(8), 4773-80.
- Harris, J. R., and Racaniello, V. R. (2005). Amino acid changes in proteins 2B and 3A mediate rhinovirus type 39 growth in mouse cells. *J Virol* **79**(9), 5363-73.
- Heinz, B. A., Rueckert, R. R., Shepard, D. A., Dutko, F. J., McKinlay, M. A., Fancher, M., Rossmann, M. G., Badger, J., and Smith, T. J. (1989). Genetic and molecular analyses of spontaneous mutants of human rhinovirus 14 that are resistant to an antiviral compound. *J Virol* **63**(6), 2476-85.
- Herold, J., and Andino, R. (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* **7**(3), 581-91.
- Hewat, E. A., Verdaguer, N., Fita, I., Blakemore, W., Brookes, S., King, A., Newman, J., Domingo, E., Mateu, M. G., and Stuart, D. I. (1997). Structure of the complex of an Fab fragment of a neutralizing antibody with foot-and-mouth disease virus: positioning of a highly mobile antigenic loop. *EMBO J* **16**(7), 1492-1500.
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**(6510), 123-6.

- Hogle, J. M., Chow, M., and Filman, D. J. (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* **229**(4720), 1358-65.
- Hohenadl, C., Klingel, K., Mertsching, J., Hofschneider, P. H., and Kandolf, R. (1991). Strand-specific detection of enteroviral RNA in myocardial tissue by in situ hybridization. *Mol Cell Probes* **5**(1), 11-20.
- Holguín, A (1996). Variantes genéticos y fenotípicos en cuasiespecies del virus de la fiebre aftosa y del virus de la inmunodeficiencia humana. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Spain.
- Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., and VandePol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**(4540), 1577-1585.
- Holland, J. J., de la Torre, J. C., Clarke, D. K., and Duarte, E. (1991). Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J Virol* **65**(6), 2960-2967.
- Horimoto, T., Rivera, E., Pearson, J., Senne, D., Krauss, S., Kawaoka, Y., and Webster, R. G. (1995). Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology* **213**(1), 223-30.
- Hsu, E. C., Sarangi, F., Iorio, C., Sidhu, M. S., Udem, S. A., Dillehay, D. L., Xu, W., Rota, P. A., Bellini, W. J., and Richardson, C. D. (1998). A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J Virol* **72**(4), 2905-16.
- Hsu, E. C., Iorio, C., Sarangi, F., Khine, A. A., and Richardson, C. D. (2001). CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* **279**(1), 9-21.
- Hjulsager, C. K., Olsen, B. S., Jensen, D. M., Cordea, M. I., Krath, B. N., Johansen, I. E., and Lund, O. S. (2006). Multiple determinants in the coding region of Pea seed-borne mosaic virus P3 are involved in virulence against sbm-2 resistance. *Virology*. En prensa.
- Jackson, T., Ellard, F. M., Ghazaleh, R. A., Brookes, S. M., Blakemore, W. E., Corteyn, A. H., Stuart, D. I., Newman, J. W., and King, A. M. (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* **70**(8), 5282-7.
- Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W., and King, A. M. (2000). The epithelial integrin $\alpha 5 \beta 1$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **74**(11), 4949-56.
- Jackson, T., Mould, A. P., Sheppard, D., and King, A. M. (2002). Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Is a Receptor for Foot-and-Mouth Disease Virus. *J Virol* **76**(3), 935-941.

- Jang, S. K., Pestova, T. V., Hellen, C. U., Witherell, G. W., and Wimmer, E. (1990). Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme* **44**(1-4), 292-309.
- King, A. M. Q., Mc Cahon, D., Slade, W. R. and Newman, J. W. I. (1982). Recombination in RNA. *Cell* **29**, 921-928.
- Komurian-Pradel, F., Perret, M., Deiman, B., Sodoyer, M., Lotteau, V., Paranhos-Baccala, G., and Andre, P. (2004). Strand specific quantitative real-time PCR to study replication of hepatitis C virus genome. *J Virol Methods* **116**(1), 103-6.
- Korner, H., and Burgert, H. G. (1994). Down-regulation of HLA antigens by the adenovirus type 2 E3/19K protein in a T-lymphoma cell line. *J Virol* **68**(3), 1442-8.
- Kuhn, R. J., Luz, N., and Beck, E. (1990). Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **64**, 4625-4631.
- Kunkel, T. A., and Alexander, P. S. (1986). The base substitution fidelity of eucaryotic DNA polymerases. Mismatching frequencies, site preferences, insertion preferences, and base substitution by dislocation. *J Biol Chem* **261**(1), 160-6.
- Kunz, S., Sevilla, N., McGavern, D. B., Campbell, K. P., and Oldstone, M. B. (2001). Molecular analysis of the interaction of LCMV with its cellular receptor [alpha]-dystroglycan. *J Cell Biol* **155**(2), 301-10.
- Lai, M. M. C. (1992). Genetic recombination in RNA viruses. *Current Top Microbiol Immunol* **176**, 21-32.
- Larder, B. A. (1994). Interactions between drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Gen Virol* **75**(Pt 5), 951-7.
- Lazaro, E., Escarmis, C., Domingo, E., and Manrubia, S. C. (2002). Modeling viral genome fitness evolution associated with serial bottleneck events: evidence of stationary states of fitness. *J Virol* **76**(17), 8675-81.
- Lazaro, E., Escarmis, C., Perez-Mercader, J., Manrubia, S. C., and Domingo, E. (2003). Resistance of virus to extinction on bottleneck passages: study of a decaying and fluctuating pattern of fitness loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19), 10830-5.
- Lea, S., Hernández, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J., Stuart, D., and Mateu, M. G. (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**(2), 123-139.
- Lea, S., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Fry, E., Jackson, T., King, A., Logan, D., Newman, J., and Stuart, D. (1995). Structural comparison of two strains of foot-and-mouth disease virus subtype O1 and a laboratory antigenic variant, G67. *Structure* **3**(6), 571-80.

- Lemon, S. M. (1997a). Targeting the Achilles' heel of hepatitis C virus. *Hepatology* **25**(4), 1035-7.
- Lemon, S. M. (1997b). Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clin Chem* **43**(8 Pt 2), 1494-9.
- Lenski, R. E., and May, R. M. (1994). The evolution of virulence in parasites and pathogens: reconciliation between two competing hypotheses. *J Theor Biol* **169**(3), 253-65.
- Lin, J. W., Chiu, H. N., Chen, I. H., Chen, T. C., Hsu, Y. H., and Tsai, C. H. (2005). Structural and functional analysis of the cis-acting elements required for plus-strand RNA synthesis of Bamboo mosaic virus. *J Virol* **79**(14), 9046-53.
- Lopez de Quinto, S., and Martinez-Salas, E. (2000). Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA* **6**(10), 1380-92.
- Lopez-Guerrero, J. A., Martinez-Abarca, F., Fresno, M., Carrasco, L., and Alonso, M. A. (1991). Cell type determines the relative proportions of (-) and (+) strand RNA during poliovirus replication. *Virus Res* **20**(1), 23-9.
- Lyle, J. M., Bullitt, E., Bienz, K., and Kirkegaard, K. (2002a). Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **296**(5576), 2218-22.
- Lyle, J. M., Clewell, A., Richmond, K., Richards, O. C., Hope, D. A., Schultz, S. C., and Kirkegaard, K. (2002b). Similar structural basis for membrane localization and protein priming by an RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **277**(18), 16324-31.
- Malirat, V., De Mello, P. A., Tiraboschi, B., Beck, E., Gomes, I., and Bergmann, I. E. (1994). Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Res* **34**(1), 31-48.
- Marks, H., van Duijse, J. J., Zuidema, D., van Hulten, M. C., and Vlak, J. M. (2005). Fitness and virulence of an ancestral White Spot Syndrome Virus isolate from shrimp. *Virus Res* **110**(1-2), 9-20.
- Martín-Hernández, A. M., Carrillo, E. C., Sevilla, N., and Domingo, E. (1994). Rapid cell variation can determine the establishment of a persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(9), 3705-3709.
- Martínez, M. A., Carrillo, C., González-Candelas, F., Moya, A., Domingo, E., and Sobrino, F. (1991). Fitness alteration of foot-and-mouth disease virus mutants: measurement of adaptability of viral quasispecies. *J Virol* **65**(7), 3954-3957.
- Martínez, M. A., Dopazo, J., Hernández, J., Mateu, M. G., Sobrino, F., Domingo, E., and Knowles, N. J. (1992). Evolution of the capsid protein genes of foot-and-

- mouth disease virus: antigenic variation without accumulation of amino acid substitutions over six decades. *J Virol* **66**(6), 3557-3565.
- Martínez, M. A., Verdaguer, N., Mateu, M. G., and Domingo, E. (1997). Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(13), 6798-6802.
- Martínez-Salas, E., Sáiz, J. C., Dávila, M., Belsham, G. J., and Domingo, E. (1993). A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *J Virol* **67**(7), 3748-3755.
- Martínez-Salas, E., Ramos, R., Lafuente, E., and Lopez de Quinto, S. (2001). Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J Gen Virol* **82**(Pt 5), 973-84.
- Martínez-Salas, E., Quinto, S. L., Ramos, R., and Fernandez-Miragall, O. (2002). IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* **84**(8), 755-63.
- Mason, P. W., Rieder, E., and Baxt, B. (1994). RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(5), 1932-1936.
- Mason, P. W., Bezborodova, S. V., and Henry, T. M. (2002). Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **76**(19), 9686-94.
- Mason, P. W., Grubman, M. J., and Baxt, B. (2003). Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res* **91**(1), 9-32.
- Masuda, T., Matsushita, S., Kuroda, M. J., Kannagi, M., Takatsuki, K., and Harada, S. (1990). Generation of neutralization-resistant HIV-1 in vitro due to amino acid interchanges of third hypervariable env region. *J Immunol* **145**(10), 3240-6.
- Masuda, M., Remington, M. P., Hoffman, P. M., and Ruscetti, S. K. (1992). Molecular characterization of a neuropathogenic and nonerythroleukemogenic variant of Friend murine leukemia virus PVC-211. *J Virol* **66**(5), 2798-806.
- Masuda, M., Hanson, C. A., Alvord, W. G., Hoffman, P. M., and Ruscetti, S. K. (1996a). Effects of subtle changes in the SU protein of ecotropic murine leukemia virus on its brain capillary endothelial cell tropism and interference properties. *Virology* **215**(2), 142-51.
- Masuda, M., Hanson, C. A., Hoffman, P. M., and Ruscetti, S. K. (1996b). Analysis of the unique hamster cell tropism of ecotropic murine leukemia virus PVC-211. *J Virol* **70**(12), 8534-9.

- Mateu, R. and Mateu, M. G. (2006). Deterministic overcompensatory mutational events in the capsid of Foot-and-Mouth Disease Virus, in response to the introduction of mutations found in viruses from persistent infections. *J Virol* Enviado a publicar.
- Mateu, M. G., Rocha, E., Vicente, O., Vayreda, F., Navalpotro, C., Andreu, D., Pedrosa, E., Giralt, E., Enjuanes, L., and Domingo, E. (1987). Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res* **8**(3), 261-274.
- Mateu, M. G., Da Silva, J. L., Rocha, E., De Brum, D. L., Alonso, A., Enjuanes, L., Domingo, E., and Barahona, H. (1988). Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology* **167**(1), 113-124.
- Mateu, M. G., Martínez, M. A., Rocha, E., Andreu, D., Parejo, J., Giralt, E., Sobrino, F., and Domingo, E. (1989). Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**(15), 5883-5887.
- Mateu, M. G., Martínez, M. A., Capucci, L., Andreu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E., and Domingo, E. (1990). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J Gen Virol* **71**, 629-637.
- Mateu, M. G., Hernández, J., Martínez, M. A., Feigelstock, D., Lea, S., Pérez, J. J., Giralt, E., Stuart, D., Palma, E. L., and Domingo, E. (1994). Antigenic heterogeneity of a foot-and-mouth disease virus serotype in the field is mediated by very limited sequence variation at several antigenic sites. *J Virol* **68**(3), 1407-1417.
- Mateu, M. G. (1995). Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res* **38**(1), 1-24.
- Mateu, M. G., Camarero, J. A., Giralt, E., Andreu, D., and Domingo, E. (1995). Direct evaluation of the immunodominance of a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus in a natural host. *Virology* **206**(1), 298-306.
- Mateu, M. G., Escarmís, C., and Domingo, E. (1998). Mutational analysis of discontinuous epitopes of foot-and-mouth disease virus using an unprocessed capsid protomer precursor. *Virus Res* **53**(1), 27-37.
- Matloubian, M., Kolhekar, S. R., Somasundaram, T., and Ahmed, R. (1993). Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **67**(12), 7340-9.
- Mayer, D., Hofmann, M. A., and Tratschin, J. D. (2004). Attenuation of classical swine fever virus by deletion of the viral N(pro) gene. *Vaccine* **22**(3-4), 317-28.

- Medina, M., Domingo, E., Brangwyn, J. K., and Belsham, G. J. (1993). The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology* **194**(1), 355-359.
- Meyers, G., Saalmuller, A., and Buttner, M. (1999). Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein E(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J Virol* **73**(12), 10224-35.
- Miller, V., and Larder, B. A. (2001). Mutational patterns in the HIV genome and cross-resistance following nucleoside and nucleotide analogue drug exposure. *Antivir Ther* **6 Suppl 3**, 25-44.
- Mirmomeni, M. H., Hughes, P. J., and Stanway, G. (1997). An RNA tertiary structure in the 3' untranslated region of enteroviruses is necessary for efficient replication. *J Virol* **71**(3), 2363-70.
- Miyashita, E. M., Yang, B., Lam, K. M., Crawford, D. H., and Thorley-Lawson, D. A. (1995). A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell* **80**(4), 593-601.
- Monaghan, P., Gold, S., Simpson, J., Zhang, Z., Weinreb, P. H., Violette, S. M., Alexandersen, S., and Jackson, T. (2005). The alpha(v)beta6 integrin receptor for Foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J Gen Virol* **86**(Pt 10), 2769-80.
- Moormann, R. J., van Gennip, H. G., Miedema, G. K., Hulst, M. M., and van Rijn, P. A. (1996). Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J Virol* **70**(2), 763-70.
- Morace, G., Pisani, G., Beneduce, F., Divizia, M., and Pana, A. (1993). Mutations in the 3A genomic region of two cytopathic strains of hepatitis A virus isolated in Italy. *Virus Res* **28**(2), 187-94.
- Morasco, B. J., Sharma, N., Parilla, J., and Flanagan, J. B. (2003). Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **77**(9), 5136-44.
- Morse, S. S. (1994). *The Evolutionary Biology of Viruses*. Raven Press, New York.
- Mrukowicz, J. Z., Wetzel, J. D., Goral, M. I., Fogo, A. B., Wright, P. F., and Dermody, T. S. (1998). Viruses and cells with mutations affecting viral entry are selected during persistent rotavirus infections of MA104 cells. *J Virol* **72**(4), 3088-3097.
- Muller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mut Res* **1**, 2-9.
- Murphy, F. A. (1994). New, emerging, and reemerging infectious diseases. *Adv Virus Res* **43**, 1-52.

- Murphy, F. A., and Nathanson, N. (1994). The emergence of new virus diseases: an overview. *Seminars in Virology* **5**, 87-102.
- Murray, K. E., and Barton, D. J. (2003). Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **77**(8), 4739-50.
- Myers, T. W., and Gelfand, D. H. (1991). Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **30**(31), 7661-6.
- Nagashima, S., Sasaki, J., and Taniguchi, K. (2005). The 5'-terminal region of the Aichi virus genome encodes cis-acting replication elements required for positive- and negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **79**(11), 6918-31.
- Nayak, A., Goodfellow, I. G., and Belsham, G. J. (2005). Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J Virol* **79**(12), 7698-706.
- Nayak, A., Goodfellow, I. G., Woolaway, K. E., Birtley, J., Curry, S., and Belsham, G. J. (2006). Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol* **80**(19), 9865-75.
- Nichol, S. T., Spiropoulou, C. F., Morzunov, S., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Feldmann, H., Sanchez, A., Childs, J., Zaki, S., and Peters, C. J. (1993). Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* **262**(5135), 914-7.
- Nielsen, C., Keena, M., and Hajek, A. E. (2005). Virulence and fitness of the fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* in its host *Lymantria dispar*, for pathogen and host strains originating from Asia, Europe, and North America. *J Invertebr Pathol* **89**(3), 232-42.
- Novak, J. E., and Kirkegaard, K. (1991). Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* **65**(6), 3384-7.
- Novella, I. S., Duarte, E. A., Elena, S. F., Moya, A., Domingo, E., and Holland, J. J. (1995a). Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(13), 5841-5844.
- Novella, I. S., Elena, S. F., Moya, A., Domingo, E., and Holland, J. J. (1995b). Size of genetic bottlenecks leading to virus fitness loss is determined by mean initial population fitness. *J Virol* **69**(5), 2869-2872.
- Núñez, J. I., Baranowski, E., Molina, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Sanchez, C., Domingo, E., and Sobrino, F. (2001). A single amino acid substitution in nonstructural protein

- 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J Virol* **75**(8), 3977-83.
- Ochoa, W. F., Kalko, S. G., Mateu, M. G., Gomes, P., Andreu, D., Domingo, E., Fita, I., and Verdaguer, N. (2000). A multiply substituted G-H loop from foot-and-mouth disease virus in complex with a neutralizing antibody: a role for water molecules. *J Gen Virol* **81**, 1495-505.
- O'Donnell, V. K., Pacheco, J. M., Henry, T. M., and Mason, P. W. (2001). Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* **287**(1), 151-62.
- Oldstone, M. B. (2006). Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. *Virology* **344**(1), 111-8.
- Pariente, N., Sierra, S., Lowenstein, P. R., and Domingo, E. (2001). Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *J Virol* **75**(20), 9723-30.
- Pariente, N., Airaksinen, A., and Domingo, E. (2003). Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **77**(12), 7131-8.
- Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D., and Wimmer, E. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* **393**(6682), 280-4.
- Paul, A. V., Rieder, E., Kim, D. W., van Boom, J. H., and Wimmer, E. (2000). Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* **74**(22), 10359-70.
- Paul, A. V., Peters, J., Mugavero, J., Yin, J., van Boom, J. H., and Wimmer, E. (2003). Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. *J Virol* **77**(2), 891-904.
- Pavio, N., Buc-Caron, M. H., and Colbere-Garapin, F. (1996). Persistent poliovirus infection of human fetal brain cells. *J Virol* **70**(9), 6395-6401.
- Pawlotsky, J. M., Germanidis, G., Neumann, A. U., Pellerin, M., Frainais, P. O., and Dhumeaux, D. (1998). Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* **72**(4), 2795-2805.
- Pawlotsky, J. M. (2000). Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology* **32**(5), 889-96.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**(6180), 320-325.

- Perales, C., Martin, V., Ruiz-Jarabo, C. M., and Domingo, E. (2005). Monitoring sequence space as a test for the target of selection in viruses. *J Mol Biol* **345**(3), 451-9.
- Pereira, H. G. (1977). Subtyping foot-and-mouth disease virus. *Devel In Biol Standard* **35**, 167-174.
- Pereira, H. G. (1981). Foot-and-mouth disease virus. In "Virus Diseases of Food animals" (R. P. G. Gibbs, Ed.), Vol. 2, pp. 333-363. Academic Press, New York.
- Pfeiffer, J. K., and Kirkegaard, K. (2003). A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12), 7289-94.
- Pfeiffer, J. K., and Kirkegaard, K. (2005). Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog* **1**(2), e11.
- Pfister, T., and Wimmer, E. (1999). Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J Biol Chem* **274**(11), 6992-7001.
- Piccone, M. E., Rieder, E., Mason, P. W., and Grubman, M. J. (1995a). The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *J Virol* **69**(9), 5376-82.
- Piccone, M. E., Zellner, M., Kumosinski, T. F., Mason, P. W., and Grubman, M. J. (1995b). Identification of the active-site residues of the L proteinase of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **69**(8), 4950-6.
- Pickrell, J., and Enserink, M. (2001). Foot-and-mouth disease. U.K. outbreak is latest in global epidemic. *Science* **291**(5509), 1677.
- Pilipenko, E. V., Blinov, V. M., Chernov, B. K., Dmitrieva, T. M., and Agol, V. I. (1989). Conservation of the secondary structure elements of the 5'-untranslated region of cardio- and aphthovirus RNAs. *Nucleic Acids Res* **17**(14), 5701-11.
- Pilipenko, E. V., Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Khitrina, E. V., Poperechnaya, A. N., Agol, V. I., and Hellen, C. U. (2000). A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev* **14**(16), 2028-45.
- Pincus, S. E., and Wimmer, E. (1986). Production of guanidine-resistant and -dependent poliovirus mutants from cloned cDNA: mutations in polypeptide 2C are directly responsible for altered guanidine sensitivity. *J Virol* **60**, 793-796.
- Pincus, S. E., Rohl, H., and Wimmer, E. (1987). Guanidine-dependent mutants of poliovirus: identification of three classes with different growth requirements. *Virology* **157**(1), 83-8.
- Pleij, C. W., Rietveld, K., and Bosch, L. (1985). A new principle of RNA folding based on pseudoknotting. *Nucleic Acids Res* **13**(5), 1717-31.

- Pogolotti, A. L., Jr., and Santi, D. V. (1982). High-pressure liquid chromatography--ultraviolet analysis of intracellular nucleotides. *Anal Biochem* **126**(2), 335-45.
- Poulin, R., and Combes, C. (1999). The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitol Today* **15**(12), 474-5.
- Pujol, F. H., and Devesa, M. (2005). Genotypic variability of hepatitis viruses associated with chronic infection and the development of hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol* **39**(7), 611-8.
- Quiñones-Mateu, M. E., and Arts, E. J. (2006). Virus fitness: concept, quantification, and application to HIV population dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**, 83-140.
- Racaniello, V. R. (2001). "Picornaviridae: The viruses and their replication." Fields Virology (D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, et. al., Eds.) Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Racaniello, V. R. (2006). One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology* **344**(1), 9-16.
- Ramos, R., and Martinez-Salas, E. (1999). Long-range RNA interactions between structural domains of the aphthovirus internal ribosome entry site (IRES). *RNA* **5**(10), 1374-83.
- Rapicetta, M., Ferrari, C., and Levrero, M. (2002). Viral determinants and host immune responses in the pathogenesis of HBV infection. *J Med Virol* **67**(3), 454-7.
- Read AF, Aaby P, Antia R, Ebert D, Ewald PW et al. (1999) What can evolutionary biology contribute to understanding virulence? In "Evolution in Health and Disease" (Sterms SC, Ed) pp. 205-215. Oxford University Press, Oxford.
- Reitz, M. S., Jr., Wilson, C., Naugle, C., Gallo, R. C., and Robert-Guroff, M. (1988). Generation of a neutralization-resistant variant of HIV-1 is due to selection for a point mutation in the envelope gene. *Cell* **54**(1), 57-63.
- Richman, D. D. (1994). Resistance, drug failure, and disease progression. *AIDS Res Hum Retrov* **10**(8), 901-5.
- Rieder, E., Bunch, T., Brown, F., and Mason, P. W. (1993). Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *J Virol* **67**(9), 5139-5145.
- Rieder, E., Henry, T., Duque, H., and Baxt, B. (2005). Analysis of a foot-and-mouth disease virus type A24 isolate containing an SGD receptor recognition site in vitro and its pathogenesis in cattle. *J Virol* **79**(20), 12989-98.
- Risatti, G. R., Holinka, L. G., Lu, Z., Kutish, G. F., Tulman, E. R., French, R. A., Sur, J. H., Rock, D. L., and Borca, M. V. (2005). Mutation of E1 glycoprotein of

- classical swine fever virus affects viral virulence in swine. *Virology* **343**(1), 116-27.
- Risatti, G. R., Holinka, L. G., Carrillo, C., Kutish, G. F., Lu, Z., Tulman, E. R., Sainz, I. F., and Borca, M. V. (2006). Identification of a novel virulence determinant within the E2 structural glycoprotein of classical swine fever virus. *Virology*. En prensa.
- Roberts, P. J., and Belsham, G. J. (1995). Identification of critical amino acids within the foot-and-mouth disease virus leader protein, a cysteine protease. *Virology* **213**(1), 140-6.
- Rodriguez, P. L., and Carrasco, L. (1993). Poliovirus protein 2C has ATPase and GTPase activities. *J Biol Chem* **268**(11), 8105-10.
- Ron, D., and Tal, J. (1985). Coevolution of cells and virus as a mechanism for the persistence of lymphotropic minute virus of mice in L-cells. *J Virol* **55**(2), 424-430.
- Ron, D., and Tal, J. (1986). Spontaneous curing of a minute virus of mice carrier state by selection of cells with an intracellular block of viral replication. *J Virol* **58**(1), 26-30.
- Rossmann, M. G., and Johnson, J. E. (1989). Icosahedral RNA virus structure. *Annu Rev Biochem* **58**, 533-573.
- Rowe, C. L., Baker, S. C., Nathan, M. J., and Fleming, J. O. (1997). Evolution of mouse hepatitis virus: detection and characterization of spike deletion variants during persistent infection. *J Virol* **71**(4), 2959-2969.
- Rowland-Jones, S. L., Phillips, R. E., Nixon, D. F., Gotch, F. M., Edwards, J. P., Ogunlesi, A. O., Elvin, J. G., Rothbard, J. A., Bangham, C. R., Rizza, C. R., and et al. (1992). Human immunodeficiency virus variants that escape cytotoxic T-cell recognition. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**(8), 1353-4.
- Rowlands, D. J., Clarke, B. E., Carroll, A. R., Brown, F., Nicholson, B. H., Bittle, J. L., Houghten, R. A., and Lerner, R. A. (1983). Chemical basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature* **306**(5944), 694-697.
- Rowlands, D. J. (1999). "Foot-and-mouth disease viruses (Picornaviridae)." *Encyclopedia of Virology* (A. a. E. Granoff, R.G., Ed.) Academic Press, London.
- Rowlands, D. J. (2003). Foot-and-mouth disease. Especial issue. *Virus Res* **91**(1), 1.
- Ruíz-Jarabo, C. M., Arias, A., Baranowski, E., Escarmís, C., and Domingo, E. (2000). Memory in viral quasispecies. *J Virol* **74**, 3543-3547.

- Ruíz-Jarabo, C. M., Arias, A., Molina-París, C., Briones, C., Baranowski, E., Escarmís, C. and Domingo, E. (2002). Duration and Fitness Dependence of Quasispecies Memory. *Journal of Molecular Biology* **315**(3), 285-296.
- Ruiz-Jarabo, C. M., Pariente, N., Baranowski, E., Davila, M., Gomez-Mariano, G., and Domingo, E. (2004). Expansion of host-cell tropism of foot-and-mouth disease virus despite replication in a constant environment. *J Gen Virol* **85**(Pt 8), 2289-97.
- Ryan, M. D., King, A. M., and Thomas, G. P. (1991). Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol* **72**(Pt 11), 2727-32.
- Ryan, M. D., and Flint, M. (1997). Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *J Gen Virol* **78**(Pt 4), 699-723.
- Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A., and Mason, P. W. (1997). Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J Virol* **71**(7), 5115-5123.
- Sáiz, J. C., and Domingo, E. (1996). Virulence as a positive trait in viral persistence. *J Virol* **70**(9), 6410-6413.
- Salt, J. S. (1993). The carrier state in foot and mouth disease--an immunological review. *Br Vet J* **149**(3), 207-223.
- Salt, J. (2004). Persistence of foot-and-mouth disease virus. In "Foot-and-mouth disease: current perspectives" (Sobrino, F. and Domingo, E., Eds), pp. 103-145. Horizon Bioscience, Wymondham, England.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). "Molecular Cloning. A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samuel, A. R., and Knowles, N. J. (2001). Foot-and-mouth disease virus: cause of the recent crisis for the UK livestock industry. *Trends Genet* **17**(8), 421-4.
- Sarnow, P. (2003). Viral internal ribosome entry site elements: novel ribosome-RNA complexes and roles in viral pathogenesis. *J Virol* **77**(5), 2801-6.
- Saunders, K., and King, A. M. (1982). Guanidine-resistant mutants of aphthovirus induce the synthesis of an altered nonstructural polypeptide, P34. *J Virol* **42**(2), 389-94.
- Saunders, K., King, A. M., McCahon, D., Newman, J. W., Slade, W. R., and Forss, S. (1985). Recombination and oligonucleotide analysis of guanidine-resistant foot-and-mouth disease virus mutants. *J Virol* **56**(3), 921-9.
- Schuitemaker, H., Koot, M., Kootstra, N. A., Dercksen, M. W., de Goede, R. E., van Steenwijk, R. P., Lange, J. M., Schattenkerk, J. K., Miedema, F., and Tersmette, M. (1992). Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1

- clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* **66**(3), 1354-60.
- Semler, B. L., and Wimmer, E. (2002). "Molecular Biology of Picornaviruses." ASM Press, Washington, D.C.
- Sevilla, N., and Domingo, E. (1996). Evolution of a persistent aphthovirus in cytolytic infections: partial reversion of phenotypic traits accompanied by genetic diversification. *J Virol* **70**(10), 6617-6624.
- Sevilla, N., Ruiz-Jarabo, C. M., Gómez-Mariano, G., Baranowski, E., and Domingo, E. (1998). An RNA virus can adapt to the multiplicity of infection. *J Gen Virol* **79**, 2971-2980.
- Sevilla, N., Kunz, S., McGavern, D., and Oldstone, M. B. (2003). Infection of dendritic cells by lymphocytic choriomeningitis virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **276**, 125-44.
- Sierra, S. (2001). Caracterización de la respuesta del virus de la fiebre aftosa a mutagénesis química. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Spain.
- Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1988). Antigenic Variation in Influenza Virus Hemagglutinins. In "RNA genetics" (E. Domingo, P. Ahlquist, and J. Holland, Eds.), Vol. III. CRC Press, Florida.
- Sobrinho, F., Dávila, M., Ortín, J., and Domingo, E. (1983). Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**, 310-318.
- Sobrinho, F., and Domingo, E. (2001). Foot-and-mouth disease in Europe. FMD is economically the most important disease of farm animals. Its re-emergence in Europe is likely to have consequences that go beyond severe alterations of livestock production and trade. *EMBO Rep* **2**(6), 459-61.
- Sobrinho, F., Sáiz, M., Jiménez-Clavero, M. A., Núñez, J. I., Rosas, M. F., Baranowski, E., and Ley, V. (2001). Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Veterinary Research* **32**, 1-30.
- Sobrinho, F., and Domingo, E. (2004). Foot-and-mouth disease: Current Perspectives, Horizon Bioscience, Wymondham, England.
- Staschke, K. A., Colacino, J. M., Baxter, A. J., Air, G. M., Bansal, A., Hornback, W. J., Munroe, J. E., and Laver, W. G. (1995). Molecular basis for the resistance of influenza viruses to 4-guanidino- Neu5Ac2en. *Virology* **214**(2), 642-6.
- Stassinopoulos, I. A., and Belsham, G. J. (2001). A novel protein-RNA binding assay: functional interactions of the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site with cellular proteins. *RNA* **7**(1), 114-22.

- Steinhauer, D. A., de la Torre, J. C., Meier, E., and Holland, J. J. (1989). Extreme heterogeneity in populations of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **63**(5), 2072-80.
- Steinhauer, D. A., Domingo, E., and Holland, J. J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* **122**(2), 281-288.
- Stewart, A. D., Logsdon, J. M., Jr., and Kelley, S. E. (2005). An empirical study of the evolution of virulence under both horizontal and vertical transmission. *Evolution Int J Org Evolution* **59**(4), 730-9.
- Stocker, M., and MacPherson, I. (1964). Syrian hamster fibroblasts cell line and its derivatives. *Nature* **203**, 155-157.
- Taboga, O., Tami, C., Carrillo, E., Núñez, J. I., Rodríguez, A., Saíz, J. C., Blanco, E., Valero, M. L., Roig, X., Camarero, J. A., Andreu, D., Mateu, M. G., Giralt, E., Domingo, E., Sobrino, F., and Palma, E. L. (1997). A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J Virol* **71**(4), 2606-2614.
- Takeda, N., Kuhn, R. J., Yang, C. F., Takegami, T., and Wimmer, E. (1986). Initiation of poliovirus plus-strand RNA synthesis in a membrane complex of infected HeLa cells. *J Virol* **60**(1), 43-53.
- Takemoto, K. K., and Habel, K. (1959). Virus-cell relationship in a carrier culture of HeLa cells and Cocksackie A9 virus. *Virology* **7**(1), 28-44.
- Tam, P. E., and Messner, R. P. (1999). Molecular mechanisms of coxsackievirus persistence in chronic inflammatory myopathy: viral RNA persists through formation of a double-stranded complex without associated genomic mutations or evolution. *J Virol* **73**(12), 10113-21.
- Tami, C., Taboga, O., Berinstein, A., Nunez, J. I., Palma, E. L., Domingo, E., Sobrino, F., and Carrillo, E. (2003). Evidence of the coevolution of antigenicity and host cell tropism of foot-and-mouth disease virus in vivo. *J Virol* **77**(2), 1219-26.
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., and Yanagi, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**(6798), 893-7.
- Teterina, N. L., Rinaudo, M. S., and Ehrenfeld, E. (2003). Strand-specific RNA synthesis defects in a poliovirus with a mutation in protein 3A. *J Virol* **77**(23), 12679-91.
- Tiley, L., King, A. M., and Belsham, G. J. (2003). The foot-and-mouth disease virus cis-acting replication element (cre) can be complemented in trans within infected cells. *J Virol* **77**(3), 2243-6.

- Timoney, J. F., Gillespie, J. H., Scott, F. W., and Barlough, J. E. (1988). In "Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals", pp. 647-667. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca, London.
- Toja, M. (1997). Caracterización molecular de un virus de la fiebre aftosa y de sus derivados persistentes. Construcción de un clon infeccioso. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Spain.
- Toja, M., Escarmis, C., and Domingo, E. (1999). Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res* **64**(2), 161-71.
- Tolskaya, E. A., Romanova, L. I., Kolesnikova, M. S., Gmyl, A. P., Gorbalenya, A. E., and Agol, V. I. (1994). Genetic studies on the poliovirus 2C protein, an NTPase. A plausible mechanism of guanidine effect on the 2C function and evidence for the importance of 2C oligomerization. *J Mol Biol* **236**(5), 1310-23.
- Tu, Z., Chapman, N. M., Hufnagel, G., Tracy, S., Romero, J. R., Barry, W. H., Zhao, L., Currey, K., and Shapiro, B. (1995). The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region. *J Virol* **69**(8), 4607-18.
- van Bakkum, J. G., Frenke, H. S., Frederiks, H. H. J., and Frenkel, S. (1959). Observations on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr Diergeneeskde* **84**, 1159-1164.
- van Gennip, H. G., Vlot, A. C., Hulst, M. M., De Smit, A. J., and Moormann, R. J. (2004). Determinants of virulence of classical swine fever virus strain Brescia. *J Virol* **78**(16), 8812-23.
- van Kuppeveld, F. J., Melchers, W. J., Kirkegaard, K., and Doedens, J. R. (1997). Structure-function analysis of coxsackie B3 virus protein 2B. *Virology* **227**(1), 111-8.
- van Ooij, M. J., Polacek, C., Glaudemans, D. H., Kuijpers, J., van Kuppeveld, F. J., Andino, R., Agol, V. I., and Melchers, W. J. (2006a). Polyadenylation of genomic RNA and initiation of antigenomic RNA in a positive-strand RNA virus are controlled by the same cis-element. *Nucleic Acids Res* **34**(10), 2953-65.
- van Ooij, M. J., Vogt, D. A., Paul, A., Castro, C., Kuijpers, J., van Kuppeveld, F. J., Cameron, C. E., Wimmer, E., Andino, R., and Melchers, W. J. (2006b). Structural and functional characterization of the coxsackievirus B3 CRE(2C): role of CRE(2C) in negative- and positive-strand RNA synthesis. *J Gen Virol* **87**(Pt 1), 103-13.
- Verdaguer, N., Mateu, M. G., Andreu, D., Giralt, E., Domingo, E., and Fita, I. (1995). Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction. *EMBO J* **14**(8), 1690-1696.

- Verdaguer, N., Mateu, M. G., Bravo, J., Domingo, E., and Fita, I. (1996). Induced pocket to accommodate the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in a neutralizing antibody against foot-and-mouth-disease virus. *J Mol Biol* **256**(2), 364-376.
- Verdaguer, N., Sevilla, N., Valero, M. L., Stuart, D., Brocchi, E., Andreu, D., Giralt, E., Domingo, E., Mateu, M. G., and Fita, I. (1998). A similar pattern of interaction for different antibodies with a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus: implications for intratypic antigenic variation. *J Virol* **72**(1), 739-748.
- Verdaguer, N., Schoehn, G., Ochoa, W. F., Fita, I., Brookes, S., King, A., Domingo, E., Mateu, M. G., Stuart, D., and Hewat, E. A. (1999). Flexibility of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus bound to a Fab fragment of a neutralising antibody: structure and neutralisation. *Virology* **255**(2), 260-268.
- Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E., and Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**(7074), 344-8.
- Wang, I. N. (2006). Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics* **172**(1), 17-26.
- Wang, W. K., Dudek, T., Zhao, Y. J., Brumblay, H. G., Essex, M., and Lee, T. H. (1998). CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10), 5740-5.
- Weaver, S. C. (1998). Recurrent emergence of Venezuelan equine encephalomyelitis. In "Emerging Infections" (W. M. Sheld, and J. Hughes, Eds.), Vol. I, pp. 27-42. ASM Press, Washington DC.
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., and Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* **56**(1), 152-79.
- Webster, R. G. (1999). Antigenic variation in influenza viruses. In "Origin and Evolution of Viruses" (E. Domingo, R. G. Webster, and J. J. Holland, Eds.), pp. 377-390. Academic Press, San Diego.
- Weiner, A. J., Geysen, H. M., Christopherson, C., Hall, J. E., Mason, T. J., Saracco, G., Bonino, F., Crawford, K., Marion, C. D., Crawford, K. A., and et al. (1992). Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8), 3468-72.
- Wimmer, E., Hellen, C. U., and Cao, X. (1993). Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet* **27**, 353-436.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Diver, W. P., Graham, M., Bateman, C., Baker, D. J., and Smith, S. S. (1988). RglB facilitated cloning of highly methylated eukaryotic DNA: the human L1 transposon, plant DNA, and DNA methylated in vitro with human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **16**(10), 4465-82.

- Woolhouse, M. E., Webster, J. P., Domingo, E., Charlesworth, B., and Levin, B. R. (2002). Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat Genet* **32**(4), 569-77.
- Xiang, W., Cuconati, A., Paul, A. V., Cao, X., and Wimmer, E. (1995a). Molecular dissection of the multifunctional poliovirus RNA-binding protein 3AB. *RNA* **1**(9), 892-904.
- Xiang, W., Harris, K. S., Alexander, L., and Wimmer, E. (1995b). Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J Virol* **69**(6), 3658-67.
- Xiang, W., Cuconati, A., Hope, D., Kirkegaard, K., and Wimmer, E. (1998). Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3D pol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J Virol* **72**, 6732-6741.
- Yin, J., Paul, A. V., Wimmer, E., and Rieder, E. (2003). Functional dissection of a poliovirus cis-acting replication element [PV-cre(2C)]: analysis of single- and dual-cre viral genomes and proteins that bind specifically to PV-cre RNA. *J Virol* **77**(9), 5152-66.
- Yuste, E., Sánchez-Palomino, S., Casado, C., Domingo, E., and López-Galíndez, C. (1999). Drastic fitness loss in human immunodeficiency virus type 1 upon serial bottleneck events. *J Virol* **73**(4), 2745-2751.
- Yuste, E., Lopez-Galindez, C., and Domingo, E. (2000). Unusual distribution of mutations associated with serial bottleneck passages of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**(20), 9546-52.
- Zhang, G., Zhang, J., and Simon, A. E. (2004). Repression and derepression of minus-strand synthesis in a plus-strand RNA virus replicon. *J Virol* **78**(14), 7619-33.
- Zhang, Y. J., Hatzioannou, T., Zang, T., Braaten, D., Luban, J., Goff, S. P., and Bieniasz, P. D. (2002). Envelope-dependent, cyclophilin-independent effects of glycosaminoglycans on human immunodeficiency virus type 1 attachment and infection. *J Virol* **76**(12), 6332-43.

